



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PPGFAR**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DIFERENTES  
FORMAS CRISTALINAS E ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE  
FLUVASTATINA**

**DOUTORADO**

**Sílvia Helena Miollo Borgmann**

**Florianópolis  
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PPGFAR**

Sílvia Helena Miollo Borgmann

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DIFERENTES  
FORMAS CRISTALINAS E ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE  
FLUVASTATINA**

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso.

Área de Concentração: Fármaco-Medicamentos Medicamentos.

Linha de Pesquisa: Garantia de qualidade de insumos produtos e serviços farmacêuticos.

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

BORGSMANN, SÍLVIA HELENA MIOLLO  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DIFERENTES FORMAS  
CRISTALINAS E ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE FLUVASTATINA /  
SÍLVIA HELENA MIOLLO BORGSMANN ; orientadora, SIMONE  
GONÇALVES CARDOSO - Florianópolis, SC, 2012.  
191 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. FLUVASTATINA. 3. POLIMORFISMO. 4.  
ESTADO SÓLIDO. 5. ESTABILIDADE. I. CARDOSO, SIMONE  
GONÇALVES. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE  
DIFERENTES FORMAS CRISTALINAS E  
ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE  
FLUVASTATINA”**

**POR**

**Silvia Helena Miollo Borgmann**

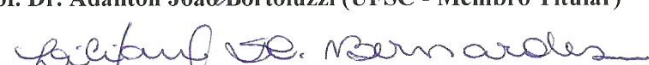
**Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pela Orientadora e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:**

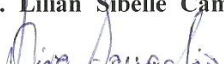
**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim (UFSC – Membro Titular)**

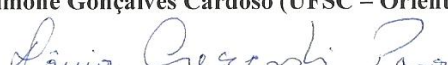
  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck (UFRGS – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi (UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Diva Sonaglio (UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Orientadora)**

  
**Prof. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da**  
**UFSC**

**Florianópolis, 20 de novembro de 2012.**

*"Sou pessoa de dentro pra fora.  
Minha beleza está na minha essência e no meu caráter.  
Acredito em sonhos, não em utopia. Mas quando sonho, sonho  
alto.  
Estou aqui é pra viver, cair, aprender, levantar e seguir em frente.  
Sou isso hoje...Amanhã, já me reinventei.  
Reinvento-me sempre que a vida pede um pouco mais de mim.  
Sou complexa, sou mistura, sou mulher com cara de menina... E  
vice-versa.  
Me perco, me procuro e me acho.  
E quando necessário, enlouqueço e deixo rolar...  
Não me dêo pela metade, não sou tua meio amiga nem teu  
quase amor.  
Ou sou tudo ou sou nada. Não suporto meio termos.  
Sou boba, mas não sou burra. Ingênua, mas não santa.  
Sou pessoa de riso fácil...e choro também!"*

*Tati Bernard*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, a quem muitas vezes recorri, solicitando a paz e a tranquilidade necessárias para a realização deste trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso pela orientação, apoio e amizade, indispensáveis, durante a graduação, Iniciação Científica, Orientação no Mestrado e durante a realização desta Tese. Agradeço também aos “puxões de orelha” muitas vezes necessários para que não transformasse esse sonho em utopia.*

*Aos meus Pais, Sílvia e Beatriz, e minha Dinda Mari, pelo incentivo, colaboração, compreensão e apoio dedicado à minha formação.*

*Ao meu irmão, Rodolfo, e sua “namorada”, Bárbara, ao meu Dindo e toda minha família que sempre acreditaram na Sílvia Helena.*

*À Dona Terezinha, que mesmo distante, por circunstâncias do destino, sempre me incentivou e apoiou nessa caminhada e com certeza incentiva minha Afilhadinha Ana Júlia a ser estudiosa como a Dinda.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Lucia Cuffini pela amizade, ensinamentos e apoio fundamentais para a elaboração deste trabalho.*

*Aos demais Professores do Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC, Hellen Karine Stulzer e Marcos Antônio Segatto Silva pela amizade, apoio e colaboração.*

*Ao Prof. Carlos Eduardo Maduro de Campos pela disponibilidade e colaboração às análises de DRX e espectroscopia Raman.*

*Ao Prof. Braga, e seus orientados, pela disponibilidade e colaboração às análises de RMN realizadas.*

*Aos demais Professores e funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.*

*Aos colegas de laboratório Aline, Amarilis, AnaCarol, Andrea Granada, Andrea Costa Rica, Andrea Koroishi, Bruno, Cassiana, Charise, Cinira, Fábio, Gabriela, Gislaine, Larissa, Manoela, Mônica, Paola, Paulo, Rafael (espero não ter esquecido ninguém!!)*

*À Gabriela Rauber, que durante um bom período foi minha IC, e agora trilha seu caminho pelo Mestrado.*

*Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais alegres de festas, viagens, congressos, casamentos, baladinhas, finais de semana na praia, almoços de domingo com direito a filme e pipoca no sofá...mas também naqueles momentos nos quais eu mais precisava, como durante o período da minha “tentativa frustrada de deixar de ser surdinha” aí vai o meu MUITO OBRIGADA, vocês foram, e continuam sendo, ESSENCIAIS na minha vida: Cassi, Ana Paula Costa, Thaísa, Alice, Dani, Ana Quirino, Regina, Patrícia e Leonardo Wanzeller, Tia Lia e família Segala, Andrea (Tia Nega), Julie Milano, Suellen, Pamela, Junior e Fernando (Tiguero), Fernando (Coisinho), Marcolino (churrasqueiro oficial da tchurma).*

*Aos meus amigos e colegas de trabalho do CAPS ad Ilha (Centro de Atenção Psicossocial para Álcool e Outras Drogas), da Prefeitura Municipal de Florianópolis, pelo apoio, incentivo e compreensão, principalmente nos momentos de surto durante a elaboração da tese: Fernanda, Fabiana Schnnor, Mari, Rose, Célia, Nilson, Valter, Helio, Deidvid, Ana, Paula, Renata, Fabiana Beli, Celeni, Leo, Neto, Emilly e Patrícia. Obrigada por não me encaminharem ao CAPS II ou IPQ (rsrs).*

*Aos meus amigos e colegas de trabalho da DIAF (Diretoria de Assistência Farmacêutica) da Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina pelos ensinamentos, coleguismo, incentivo e compreensão: Amanda, Andrea (e sua fofuxa Marina), Carla, Cléo, Fernanda, Giselly, Lia, Márcia, Maurílio, Orlando, Patrícia (e o lindo do Bê), Rachel, Regina, Renata, Thaís e Vera.*

*À FAPESC e ao PGFAR pela colaboração e incentivo financeiro para a execução dos experimentos e oportunidade de participação em eventos científicos para apresentação dos resultados deste trabalho.*

*À UFSC e PGFAR por possibilitarem a realização deste trabalho.*

*A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*



## RESUMO

*Fluvastatina (FLV) é um fármaco pertencente à classe das estatinas, as quais têm como mecanismo de ação a inibição da enzima HMG-CoA redutase inibindo assim a síntese de colesterol. FLV, diferentemente das outras estatinas, possui origem sintética e é estruturalmente diferente dos demais fármacos da classe. No presente trabalho foram realizados estudos de caracterização no estado sólido com o objetivo de identificar diferentes formas cristalinas de FLV após sua cristalização em diferentes solventes. As técnicas utilizadas para o estudo de polimorfismo foram: Difração de Raios X, Análise Térmica (DSC e TG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopias de RMN (líquido e sólido), Raman e Infravermelho. A caracterização de FLV no estado sólido foi realizada com matéria-prima de FLV (FLV-MP), substância química de referência da farmacopéia americana (FLV-USP) e matéria-prima cristalizada em acetonitrila (FLV-ACN) e etanol (FLV-EOH). A caracterização permitiu realizar a identificação de duas diferentes formas cristalinas de FLV na forma de hidrato. As amostras FLV-MP e FLV-ACN foram identificadas como Forma I e são diferentes de FLV-USP, que foi designada como Forma II. Identificou-se a forma de solvato com mistura de fases para a amostra FLV-EOH. Observou-se ainda o comportamento das amostras em função do tempo e temperatura, que possibilitou a identificação da Forma I como a forma mais estável frente às condições avaliadas. Desenvolveu-se método para avaliar a Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI) de suas diferentes formas cristalinas, o qual demonstrou que diferenças na forma cristalina e no hábito cristalino do sólido interferem na VDI de FLV. O trabalho teve também como objetivo realizar estudos de estabilidade de FLV em solução e no estado sólido. A estabilidade em solução foi conduzida modificando-se os solventes e seus pHs e submetendo FLV-MP, em solução, a condições variadas de temperatura e exposição à luz UV. Observou-se maior instabilidade da FLV em condições ácidas e em meio aquoso, bem como com o aumento na temperatura e a exposição à luz UV. Para o estudo de estabilidade no estado sólido as amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH foram expostas à luz UV e através de método cromatográfico os produtos majoritários de degradação foram quantificados e as*

velocidades da cinética de degradação foram definidas para cada condição avaliada. Embora tenha ocorrido diminuição no teor da concentração inicial semelhante para todas as amostras ao final de 15 dias de exposição, percebeu-se a formação de produtos de degradação em maior concentração para FLV-EOH. Para avaliar a toxicidade de FLV e suas diferentes formas cristalinas, realizou-se teste de citotoxicidade das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH em fibroblastos de gengiva humana na presença, ou não, de seus PD. Embora tenham sido quantificados apenas 3% de PD para FLV-ACN e cerca de 45% de PD para FLV-EOH, a toxicidade apresentada por FLV-ACN na presença de seus PD foi semelhante à FLV-EOH, o que sugere que algum dos PD de FLV-ACN possua um grau considerável de toxicidade.

*Palavras chave: fluvastatina, polimorfismo, estado sólido, VDI, estabilidade, citotoxicidade.*

## ABSTRACT

*Fluvastatin (FLV) is a drug belonging to the class of statins, which has the action mechanism of inhibiting the enzyme HMG-CoA reductase thereby inhibiting cholesterol synthesis. FLV, unlike other statins, has synthetic origin and is structurally different from other drugs in the class. In the present paper were performed characterization studies in solid state with the objective of identifying different crystalline forms of FLV after its crystallization in different solvents. The techniques used for the study of polymorphism were: X-Ray Diffraction, Thermal Analysis (DSC and TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM) and NMR spectroscopy (liquid and solid), Raman and Infrared. The characterization of the solid state FLV was performed with raw material of FLV (FLV-RM), Chemical Reference United States Pharmacopoeia (FLV-USP) and raw material crystallized in acetonitrile (FLV-ACN) and ethanol (FLV-EOH). The characterization data resulted in the identification of two different crystalline forms of FLV as the hydrate. Samples FLV-RM and FLV-ACN were identified as Form I and are different from FLV-USP, which was designated as Form II. The solvate form was identified for the sample FLV-EOH with a mixture of phases. Also observed the behavior of the samples in function of time and temperature, which allowed for the identification of Form I as the most stable form due to the conditions evaluated. Developed method to evaluate the Intrinsic Dissolution Rate (IDR) their different crystalline forms, which showed differences in crystal form and habit of the crystalline solid interfere FLV IDR. The study aimed also conduct stability studies of FLV in solution and solid state. The solution stability was conducted by modifying the solvents and their pHs and subjecting FLV-RM, in solution, to varying conditions of temperature and exposure to UV light. There was greater instability FLV under acidic conditions and in aqueous and with the increase in temperature and exposure to UV light. For the study of solid state stability samples FLV-RM, FLV-ACN and FLV-EOH were exposed to UV light through chromatographic method and the major products of degradation are quantified and the kinetics of degradation for each condition evaluated were defined. Although there was a decrease in the content of the initial concentration similar for all samples at the end of 15 days exposure, it was observed the formation of*

*degradation products (DP) in higher concentration to FLV-EOH. To evaluate the toxicity of FLV and its different crystalline forms held cytotoxicity test samples FLV-RM, FLV-ACN and FLV-EOH in human gingival fibroblasts in the presence or absence of their DP. While there have been quantified only 3% for DP of FLV-ACN and approximately 45% for FLV-EOH, toxicity presented by FLV-ACN before his DP was similar to FLV-EOH, suggesting that some of the DP FLV-ACN has a considerable degree of toxicity.*

*Keywords: fluvastatin, polymorphism, solid state, IDR, stability, cytotoxicity.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação de síntese do mevalonato, precursor do colesterol, por ação da enzima HMG-CoA redutase (Fonte: adaptação de Lehninger, Nelson & Cox, 2006).....	30
Figura 2- Estrutura geral das estatinas destacada nas estruturas moleculares de alguns fármacos e nas estruturas do substrato e do produto final da ação da HMG-CoA redutase (Fonte: adaptação de Lehninger, Nelson & Cox, 2006).....	31
Figura 3- Estrutura química da Fluvastatina sódica..	33
Figura 4 - Esquema ilustrativo dos fatores que interferem no processo de cristalização mediada por solventes .....	63
Figura 5 - Difractogramas de Raios X das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-MP; c) FLV-USP; d) FLV-EOH .....	73
Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura das diferentes formas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-MP; d) FLV-EOH.....	75
Figura 7 - Curvas de DSC das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP.....	76
Figura 8 - Curvas TG e DTG das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP.....	79
Figura 9 - Curvas DTG ampliadas das diferentes formas cristalinas de FLV a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP.....	79
Figura 10 - Espectros $^{13}\text{C}$ CP/MAS RMN sólido de FLV-MP (a) e FLV-EOH (b) (* deslocamentos químicos diferentes dos deslocamentos encontrados em FLV-MP).....	79

Figura 11 - Espectros $^{13}\text{C}$ CP/MAS RMN sólido NQS de FLV-MP (a) e FLV-EOH (b) (* deslocamentos químicos diferentes dos deslocamentos encontrados em FLV-MP). .....	84
Figura 12 - Espectros de FT-IR obtidos das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP. ....	86
Figura 13 - Espectros Raman obtidos das amostras a) FLV-ACN e b) FLV EOH ( $1800\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ ) .....	87
Figura 14 – Gráficos da VDI das pastilhas produzidas utilizando diferentes pressões. ....	89
Figura 15 - Representação gráfica da VDI das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-MP; b) FLV-ACN; c) FLV-EOH.....	90
Figura 16 - Padrões de Raios-X das diferentes formas cristalinas de FLV em diferentes tempos de coleta. a) FLV-MP; b) FLV-USP; c) FLV-EOH. ....	93
Figura 17 - Curvas de DSC das diferentes formas cristalinas de FLV em diferentes períodos de tempo. a) FLV-MP b) FLV-USP c) FLV-EOH .....	95
Figura 18 - Padrões de Difração de Raios X das diferentes formas cristalinas de FLV após tratamento térmico em diferentes temperaturas. a) FLV-ACN; b) FLV-EOH. ....	97
Figura 19 - Padrões de Difração de Raios X de FLV-MP após tratamento térmico em DSC a $110^{\circ}\text{C}$ .....	98
Figura 20 - Espectros $^{13}\text{C}$ CP/MAS NMR sólido de a) FLV-EOH b) FLV-EOH depois de uma hora a $80^{\circ}\text{C}$ .....	99
Figura 21 - FLV e os produtos de fotodegradação (MIELCAREK, 2005). ....	116
Figura 22 - Produtos de fotodegradação (CERMOLA, 2007). .	117

Figura 23 - Mecanismo de lactonização do grupo hidroxiácido da FLV (adaptação de GRABARKIEWICZ et al., 2006). .....	118
Figura 24 - Cromatoplaça apresentando FLV e seus produtos de degradação presentes na amostra após exposição à luz UV 254 e 365 nm – visualização em UV/254 nm. ....	132
Figura 25 - Gráfico da concentração de FLV em água versus tempo em dias. ....	135
Figura 26 - Gráfico de LogC de FLV em condições ácidas versus tempo em dias. ....	135
Figura 27 - Gráfico da fração 1/concentração de FLV em condições básicas e solventes orgânicos versus tempo em dias. ....	136
Figura 28 - Cromatoplaça em luz ultravioleta apresentando a banda característica da SQR de Fluvastatina e as amostras do fármaco após mantidas em diferentes diluentes, a 60 °C (fase fixa: sílica-gel; fase móvel: diclorometano:metanol (95:5 V/V); visualização em UV/254 nm). ....	136
Figura 29 - Gráfico da fração de 1/concentração de FLV em água em diferentes temperaturas versus tempo em dias.....	138
Figura 30 - Gráfico de Arrhenius. ....	139
Figura 31 - Gráfico do teor de fluvastatina versus tempo em diferentes solventes expostos a luz ultravioleta 365 nm. ....	140
Figura 32 - Gráfico do teor de fluvastatina versus tempo em diferentes solventes expostos a luz ultravioleta 254 nm. ....	140
Figura 33 - Gráfico do teor de FLV e seus produtos majoritários versus tempo (horas), fotólise em solução metanólica.....	141
Figura 34 - Cromatogramas utilizados como representação do decaimento da concentração de fluvastatina em soluções metanólicas expostas a luz ultravioleta 254 nm (esquerda) e 365 nm (direita) de acordo com o tempo de exposição.....	142

Figura 35 - Gráfico do teor de FLV e seus produtos majoritários versus tempo (horas), fotólise em acetonitrila..... 143

Figura 36 - Cromatogramas utilizados como representação do decaimento da concentração de fluvastatina em acetonitrila exposta a luz ultravioleta 254 nm (esquerda) e 365 nm (direita) de acordo com o tempo de exposição..... 144

Figura 37 - Gráfico do teor de FLV e seu produto majoritário versus tempo (horas), fotólise em solução aquosa. .... 145

Figura 38 - Cromatogramas utilizados como representação do decaimento da concentração de fluvastatina em soluções aquosas expostas a luz ultravioleta 254 nm (esquerda) e 365 nm (direita) de acordo com o tempo de exposição..... 146

Figura 39 - Cromatogramas das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH e seus produtos de degradação majoritários, antes e após a exposição à luz UV (365 nm), nos tempos zero, 7 e 15 dias. .... 151

Figura 40 - Representação gráfica do decaimento do teor das amostras (a: FLV-MP, FLV-ACN e FLV-ETOH) e das amostras e seus produtos majoritários (b: FLV-MP; c: FLV-ACN e d: FLV-ETOH) em função do tempo.. .... 152

Figura 41 - Padrões de DRX das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH antes (a) e após 15 dias de exposição à luz UV (b). 154

Figura 42 - Representação gráfica da cinética de segunda ordem (1/C) das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH..... 156



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos com as curvas de DSC das diferentes formas cristalinas de FLV.....	76
Tabela 2 - Determinação do conteúdo de água por Karl-Fischer. .....	77
Tabela 3 - Resultados obtidos com as curvas TG e determinação de água por KF das diferentes formas cristalinas de FLV.....	80
Tabela 4 - Dados espectrais de $^{13}\text{C}$ RMN FLV em DMSO, dados reportados em $\text{CD}_3\text{OD}$ comparativos com $^{13}\text{C}$ CP/MAS RMN sólido. ....	80
Tabela 5 - Equação da reta e r obtidos com a representação gráfica dos resultados dos ensaios de dissolução intrínseca das pastilhas de FLV de 210 e 400 kgf.....	89
Tabela 6 - Equação da reta e r obtidos com a representação gráfica dos resultados dos ensaios de dissolução intrínseca das pastilhas de FLV e valores calculados da VDI.....	91
Tabela 7 - E Resultados obtidos com as curvas de DSC das amostras FLV-EOH e FLV-USP .....	96
Tabela 8 - Descrição das condições dos estudos de estabilidade recomendados pela ANVISA para avaliação da estabilidade de medicamentos. ....	110
Tabela 9 - Equações de cinética de degradação. ....	114
Tabela 10 - Resultados de co-validação do método cromatográfico.....	130
Tabela 11 - Coeficientes de correlação (r) e demais dados obtidos a partir dos gráficos construídos, sendo destacada a ordem da reação para as respectivas condições. ....	133

Tabela 12 - Coeficientes de correlação (r) e demais dados obtidos, sendo destacada a ordem da reação para as respectivas temperaturas. .... 138

Tabela 13 - Coeficientes de correlação (r) e demais dados obtidos, sendo destacada a ordem da reação para os respectivos sistemas. .... 147

Tabela 14 - Teor em % das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH, e de seus respectivos produtos de degradação majoritários antes da exposição à luz UV e após os diferentes períodos de exposição. .... 150

Tabela 15 - Coeficientes de correlação (r) e dados cinéticos, sendo destacada a ordem da reação para cada amostra avaliada. .... 155

Tabela 16 - Valores de  $CC_{50}$  das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH calculados após teste de viabilidade celular ..... 158

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BD	Biodisponibilidade
BE	Bioequivalência
CC <sub>50</sub>	Concentração de cada amostra que reduz em 50% a viabilidade celular
CCD	Cromatografia em Camada delgada
CD <sub>3</sub> OD	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Co	Concentração inicial do fármaco no tempo zero
CP/MAS	Cross-polarization/magic-angle sample-spinning (polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico)
CSD	Base de dados cristalográficos de Cambridge
DM	Diabetes Mellitus
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DRX	Difração de Raios-X de Pó
DSC	Differential scanning calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)
DTA	Differential Thermal Analysis (Análise Térmica Diferencial)
DTG	Derivative Thermogravimetry (Derivação da curva termogravimétrica)
Ea	Energia de ativação
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
FDA	Food and Drug Administration
FLV	Fluvastatina Sódica
FLV-ACN	Matéria-Prima de Fluvastatina recristalizada em Acetonitrila
FLV-EOH	Matéria-Prima de Fluvastatina recristalizada em Etanol
FLV-MP	Matéria-Prima de Fluvastatina
FLV-USP	Padrão de Fluvastatina Sódica oriundo da Farmacopeia Americana (USP)
FT-IR	Fourier Transformed Infra Red

	(Infravermelho por Transformada de Fourier)
HMGCoA	Hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
ICH	International Conference on Harmonization
ICT's	Instituições Científicas e Tecnológicas
IFAs	Insumos Farmacêuticos ativos
K	Constante da velocidade de reação
KF	Karl-Fischer
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPI	Lei de Propriedade Industrial
MEM	Minimal Essential Medium (meio de cultura)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio
NIT's	Núcleos de Inovação Tecnológica
NO	Óxido Nítrico
NQS	Non-quaternary carbon suppression
PD1	Produto de degradação 1
PD2	Produto de degradação 2
PD3	Produto de degradação 3
PI	Propriedade Industrial
PSA	Solução de Penicilina, Streptomicina e Anfotericina
PVC	Policloreto de Polivinila
R	Coeficiente de Correlação Linear
Rf	Índice de Retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNes	Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido
t <sub>50%</sub>	Tempo em que a amostra atinge 50% da concentração inicial
t <sub>90%</sub>	Tempo em que a amostra atinge 90% da concentração inicial
TA	Temperatura Ambiente

TG	Thermogravimetry (Termogravimetria)
USP	United States Pharmacopoeia (Farmacopeia Americana)
UV	Ultravioleta
VD	Velocidade de Dissolução
VDI	Velocidade de Dissolução Intrínseca



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	27
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	29
2.1 ESTATINAS	29
2.2 FLUVASTATINA: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	32
2.3 ESTATINAS E PATENTES	33
<b>3 OBJETIVOS</b>	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>CAPÍTULO I Estudos no Estado Sólido</b>	40
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b>	41
4.1 O CONTROLE DE QUALIDADE DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS E O POLIMORFISMO	41
4.2 A TEORIA DO ESTADO SÓLIDO E O POLIMORFISMO EM FÁRMACOS	43
<b>4.2.1 Propriedades Cristalinas</b>	43
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA NO ESTADO SÓLIDO	47
<b>4.3.1 Difração de Raios-X</b>	49
<b>4.3.2 Técnicas Termoanalíticas</b>	51
a) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
b) Termogravimetria	52
<b>4.3.3 Espectroscopias</b>	53
a) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	54
b) Espectroscopia Raman	55
c) Ressonância Magnética Nuclear	56
<b>4.3.4 Microscopia</b>	58
<b>4.3.5 Dissolução Intrínseca</b>	59
<b>4.3.6 Cristalização</b>	62
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	65
5.1 MATERIAIS	65
5.2 MÉTODOS	65
<b>5.2.1 Preparação de diferentes formas cristalizadas de FLV</b>	65
<b>5.2.2 Técnicas de Caracterização no estado sólido</b>	65
<b>5.2.2.1 Difração de Raios X de pó (DRX)</b>	65
<b>5.2.2.2 Análise Térmica: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)</b>	66

<b>5.2.2.3 Técnicas espectroscópicas.....</b>	<b>66</b>
a) Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	66
b) Espectroscopia Raman.....	66
c) Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	67
<b>5.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....</b>	<b>67</b>
<b>5.2.2.5 Dissolução Intrínseca.....</b>	<b>67</b>
a) Preparo das Pastilhas.....	68
b) Procedimento.....	68
<b>5.2.2.6 Análise de Teor.....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.2.7 Determinação de água por Karl-Fischer (KF).....</b>	<b>69</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS EM CONDIÇÕES AMBIENTE.....	71
6.2 CARACTERIZAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DO TEMPO E A TEMPERATURA.....	91
6.3 DISCUSSÃO DOS RESAULTADOS: CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	101
<b>CAPÍTULO II Estudos de Estabilidade.....</b>	<b>106</b>
<b>7 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>107</b>
7.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	107
7.2 ESTUDOS DE ESTABILIDADE: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	108
7.3 ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE.....	111
7.4 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE.....	112
7.5 ESTUDOS DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.....	112
7.6 ESTABILIDADE DA FLUVASTATINA.....	115
<b>8 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
8.1 MATERIAIS.....	121
8.2 MÉTODOS.....	121
<b>8.2.1 Acompanhamento da degradação.....</b>	<b>121</b>
<b>8.2.2 Estudos em Solução.....</b>	<b>122</b>
a) Avaliação em diferentes solventes e Ph.....	122
b) Influência da temperatura.....	122
c) Influência da luz ultravioleta (UV).....	122
d) Cinética de degradação.....	123
<b>8.2.3 Estudo de Estabilidade no Estado Sólido.....</b>	<b>123</b>
8.2.3.1 Análise das amostras por CLAE.....	124
8.2.3.2 Cálculos cinéticos.....	125
8.2.4 Difração de Raios X (DRX).....	125



<b>8.2.5 Estudos de citotoxicidade.....</b>	<b>125</b>
<b>a) Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT).....</b>	<b>125</b>
<b>9 RESULTADOS.....</b>	<b>129</b>
<b>9.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO.....</b>	<b>129</b>
<b>9.1.1 Avaliação dos Métodos de acompanhamento da Degradação.....</b>	<b>129</b>
<b>9.1.2 Avaliação em diferentes solventes e pH.....</b>	<b>132</b>
<b>9.1.3 Influência da temperatura.....</b>	<b>137</b>
<b>9.1.4 Influência da luz Ultravioleta (UV).....</b>	<b>139</b>
<b>9.2 ESTUDOS DE ESTABILIDADE NO ESTADO SÓLIDO.....</b>	<b>147</b>
<b>9.2.1 Análise das amostras por CLAE.....</b>	<b>149</b>
<b>9.3 CITOTOXICIDADE.....</b>	<b>156</b>
<b>10 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS: ESTABILIDADE...</b>	<b>159</b>
<b>11 CONCLUSÃO.....</b>	<b>164</b>
<b>12 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>168</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente as doenças cardiovasculares têm sido consideradas como uma das maiores causas de mortalidade em nível mundial. Vários fatores relacionados diretamente à elevada incidência de eventos cardiovasculares já foram demonstrados, dentre os fatores, podem ser citados principalmente o tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus (DM) e a dislipidemia. Ainda são considerados fatores importantes a dieta pouco diversificada e a baixa atividade física. Tais fatores interagem levando ao estabelecimento da aterosclerose (BRESLOW, 1997; FANNING, 2004; MOREIRA et al., 2006; WHO, 2007; BRASIL, 2008; WHO, 2009). A aterosclerose é uma doença inflamatória que ocorre em resposta à agressão endotelial. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular evoluindo para o trombo plaquetário devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas oxidadas, principalmente a lipoproteína de baixa densidade (LDL), rica em colesterol. Acredita-se que tais lipoproteínas sejam mediadoras do processo inflamatório, além dos fatores de risco já citados como hipertensão arterial e tabagismo (GAW, 2004; LAWES et al., 2004; ECKARDSTEIN, 2005; SPOSITO et al., 2007).

Diversos fármacos reduzem o LDL-colesterol, tais como, fibratos, inibidores da absorção de colesterol, ácido nicotínico e seus derivados e ainda as estatinas. As estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa uma etapa limitante na síntese do colesterol. A fluvastatina sódica (FLV, Figura 3) é a primeira estatina de origem sintética, sendo estruturalmente diferente dos demais fármacos da classe (CAMPO; CARVALHO, 2007). Quimicamente corresponde ao sal sódico do ácido  $\pm [R^*, S^*-(E)]$ -7-[3-(4-fluorfenil)-1-(1-metiletil)-1H-indol-2-il]-3,5-diidroxio-6-heptenóico, com massa molar de 433,45 g/mol. Apresenta-se na forma de pó cristalino branco a amarelo pálido, é higroscópico, solúvel em água, etanol e metanol e funde com decomposição entre 194°C e 197°C. O fármaco é comercializado como mistura racêmica de dois estereoisômeros, (+)-3R,5S e (-)-3S,5R, sendo que a forma 3R, 5S possui atividade 30 vezes superior à forma 3S, 5R (TORESO; ERIKSSON, 1997; TORESO; ERIKSSON,

1996; MOFFAT et al., 2004; TRUNG et al., 2008; LI, 2009; ZACHARIA, TANAKA; HAYASHI, 2010).

Embora a caracterização física de fármacos no estado sólido tenha se tornado uma área de grande interesse na farmácia, para alguns fármacos, tais como a FLV, estudos sobre a caracterização do estado sólido de diferentes formas cristalinas ainda não foram relatados. A caracterização do estado sólido dos fármacos é um passo importante no desenvolvimento de fármacos devido às suas implicações na física e fatores físico-químicos (densidade, estabilidade química, ponto de fusão, solubilidade, etc) que podem afetar significativamente o desempenho das formas farmacêuticas (SORRENTI et al., 2012).

A forma sólida de uma substância farmacêutica influencia grandemente as suas propriedades e o seu desempenho, tais como estabilidade e biodisponibilidade. Considerando que os fármacos são comumente disponibilizados em formas farmacêuticas sólidas, um aspecto fundamental para o seu desenvolvimento é compreender a química do estado sólido do composto (ENMAN, et al., 2011). Embora existam muitos estudos referentes à degradação de fármacos em solução, relativamente poucos estudos têm sido realizados no estado sólido (GLASS, NOVAK; BROWN, 2004). Considerando que cada estado cristalino possui um nível de energia diferente e uma diferente reatividade química, estudos desta natureza são relevantes.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização de diferentes formas cristalinas de FLV no estado sólido, assim como avaliar a estabilidade do fármaco em solução e a estabilidade química e toxicológica de diferentes formas sólidas de FLV, cristalizadas em diferentes solventes, frente à exposição à luz UV.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTATINAS

As estatinas são divididas em dois grupos: estatinas de primeira e segunda geração. As estatinas de primeira geração, também chamadas de estatinas naturais, possuem origem no metabolismo dos fungos. Fazem parte desse grupo a sinvastatina e a pravastatina. Já as estatinas de segunda geração possuem origem sintética e são estruturalmente diferentes das estatinas de primeira geração. Como representantes desse grupo encontram-se a atorvastatina, a rosuvastatina e a Fluvastatina (FLV) (BRUNTON, 2006).

As estatinas têm sua origem em culturas de fungos, tendo sido realizado, no ano de 1976, o primeiro isolamento de uma substância desta classe. A Compactina foi isolada a partir de uma cultura de *Penicillium citrinum* e apresentou excelente inibição na síntese do colesterol, porém sua elevada toxicidade impediu seu uso clínico. A partir de então, produziram-se diversas substâncias com estruturas semelhantes à Compactina que também possuíam a capacidade de inibir a síntese do colesterol, surgindo então as estatinas (CAMPO; CARVALHO, 2007).

As doenças cardiovasculares são hoje a maior causa de mortalidade no mundo. Estima-se que elas sejam responsáveis por mais de um terço dos óbitos globais, superando as mortes por doenças infecciosas, deficiências nutricionais e afecções maternas e perinatais combinadas (BRESLOW, 1997; WHO, 2007; BRASIL, 2008). Diversos estudos já foram realizados demonstrando que existem vários fatores diretamente relacionados à elevada incidência de eventos cardiovasculares, principalmente o tabagismo, a hipertensão arterial, a dislipidemia e o diabetes mellitus (DM), dieta pouco diversificada e baixa atividade física. Estes fatores interagem formando uma rede causal que, em última análise, leva ao estabelecimento da aterosclerose (WHO, 2007; BRASIL, 2008; WHO, 2009; FANNING, 2004).

A aterosclerose consiste em uma resposta inflamatória fibroproliferativa originada por dano ao tecido endotelial e que pode evoluir para a formação de um trombo plaquetário. Acredita-se que este processo seja mediado por lipoproteínas

oxidadas, principalmente a lipoproteína de baixa densidade (LDL), rica em colesterol (GAW, 2004; LAWES et al., 2004; ECKARDSTEIN, 2005).

Dentre os diversos fatores de risco para doença cardiovascular, a dislipidemia vem surgindo com um dos mais importantes. Estudos randomizados e controlados com placebo demonstraram que a diminuição dos níveis do colesterol total e LDL-colesterol está associada a uma menor incidência de eventos cardiovasculares (Infarto Agudo do Miocárdio e Acidente Vascular Cerebral) (KREISBERG; OBERMAN, 2002).

Vários fármacos diminuem o LDL-colesterol: os fibratos, os inibidores da absorção do colesterol, o ácido nicotínico e seus derivados e as estatinas. As estatinas fazem parte de uma notável classe de medicamentos redutores de colesterol, são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa uma etapa limitante na síntese do colesterol, conforme se verifica na Figura 1 (CAMPBELL, 2000; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; RANG et al., 2008).

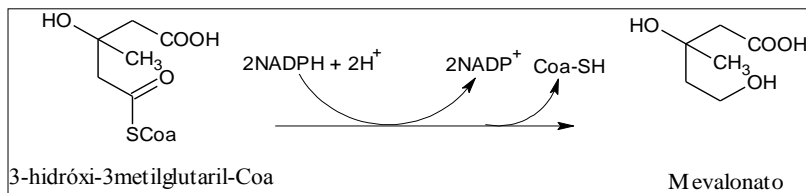


Figura 1 - Reação de síntese do mevalonato, precursor do colesterol, por ação da enzima HMG-CoA redutase (Fonte: adaptação de Lehninger; Nelson; Cox, 2006).

Acredita-se que o mecanismo de ação destes fármacos seja devido à sua similaridade com o mevalonato, fato que justifica a estrutura geral das estatinas (Figura 2) (LEHNINGER, NELSON; COX, 2006). Da mesma maneira, a atividade destes compostos é sensível à estereoquímica do anel lactona, à habilidade deste anel ser hidrolisado e ao comprimento da ponte conectando o sistema “anel lactônico” e o sistema “anel bicíclico”. Substituições no anel bicíclico com grupos lipofílicos promovem um incremento na atividade da molécula (HARROLD, 2002; MOFFAT et al., 2004).

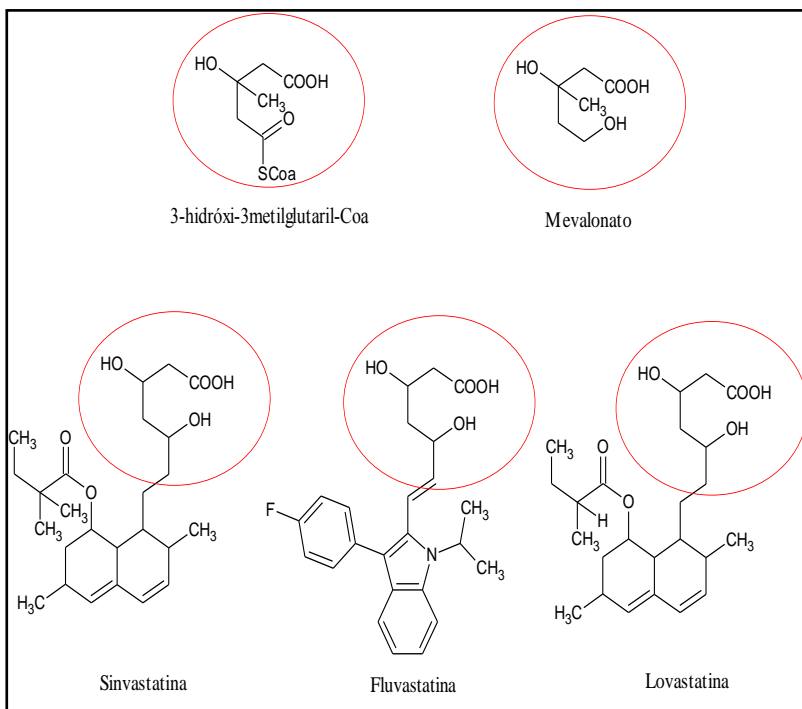


Figura 2 - Estrutura geral das estatinas destacada nas estruturas moleculares de alguns fármacos e nas estruturas do substrato e do produto final da ação da HMG-CoA redutase (Fonte: adaptação de Lehninger, Nelson; Cox, 2006).

O mecanismo de ação das estatinas para redução do colesterol se deve à inibição da enzima HMG-CoA redutase, por meio de uma afinidade destes fármacos com o sítio ativo da enzima. As estatinas inibem a síntese do colesterol endógeno e aumentam a expressão dos receptores para LDL nos hepatócitos, promovendo uma maior captação das lipoproteínas circulantes (RANG et al., 2008; STOJAKOVIC et al., 2010). Além disso, elas podem apresentar uma série de outros efeitos, como vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (NO), estímulo de formação óssea, proteção contra eventos oxidativos nas lipoproteínas de baixa densidade, modificação da resposta imune em diversos níveis e o estímulo da reendotelialização, bem como

efeito anti-inflamatório e redução nos níveis da proteína C reativa (ISTVAN; DEISENHOFER, 2003; ZEISER et al., 2008; FUKUDA et al., 2009).

Os efeitos terapêuticos das estatinas relacionados à redução dos níveis lipídicos são inquestionáveis, muito embora, o uso dessa classe esteja associado a alguns efeitos colaterais, como por exemplo, hepatotoxicidade, que é dose-dependente, e ocorre em 0,5 a 2,0% dos pacientes, e miopatia (NCEP, 2002; BROWN, 2008; JOSAN, MAJUMDAR, MCALISTER, 2008).

Há relatos de que as atividades cotidianas de pacientes que fazem uso de estatinas sofrem interferência devido ao desconforto promovido em virtude de dores, câimbras e rigidez muscular. Tais sintomas desaparecem ao ser descontinuada a administração desses fármacos (BRUCKERT et al., 2005; FRANC et al., 2003; THOMPSON, CLARKSON, ROSENSON, 2006).

FLV é o primeiro inibidor da HMG-CoA redutase de origem sintética, estruturalmente distinta das estatinas produzidas a partir do metabolismo de fungos, como a lovastatina, pravastatina e a sinvastatina. Todos os inibidores da HMG-CoA redutase possuem metabolização hepática, contudo variam consideravelmente em sua extensão de absorção e excreção hepática após administração oral (LEVY; TROENDLE; FATTU, 1993; BLUM, 1994; OHTAWA, et al., 1989). A FLV possui como característica uma baixa distribuição sistêmica, o que contribui para proteção de tecidos periféricos de efeitos indesejáveis, como rabdomiólise e miopatia, além de possuir meia vida de eliminação curta e alta ligação às proteínas plasmáticas (LEVY; TROENDLE; FATTU, 1993; BLUM, 1994). No ano de 1993 foi concedida a patente de FLV com aprovação pelo órgão americano Food and Drug Administration (FDA) expirando em 2011 (FDA, 1993).

## 2.2 FLUVASTATINA: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

FLV corresponde quimicamente ao sal sódico do ácido  $\pm$  [R\*,S\*-(E)]-7-[3-(4-fluorfenil)-1-(1-metiletil)-1H-indol-2-il]-3,5-diidrox-6-heptenóico (Figura 3), com massa molar de 433,45 g/mol. Apresenta-se na forma de pó cristalino branco a amarelo pálido, é higroscópico, solúvel em água, etanol e metanol e funde



com decomposição entre 194°C e 197°C; soluções aquosas a 1% caracterizam-se por pH na faixa de 8 a 10 (MOFFAT et al., 2004). O fármaco é comercializado como mistura racêmica de dois estereoisômeros, (+)-3R,5S e (-)-3S,5R, sendo que a forma 3R, 5S possui atividade 30 vezes superior à forma 3S, 5R (TRUNG et al., 2008; LI, 2009; ZACHARIA; TANAKA; HAYASHI, 2010; TORESON, ERIKSSON, 1996 e 1997).

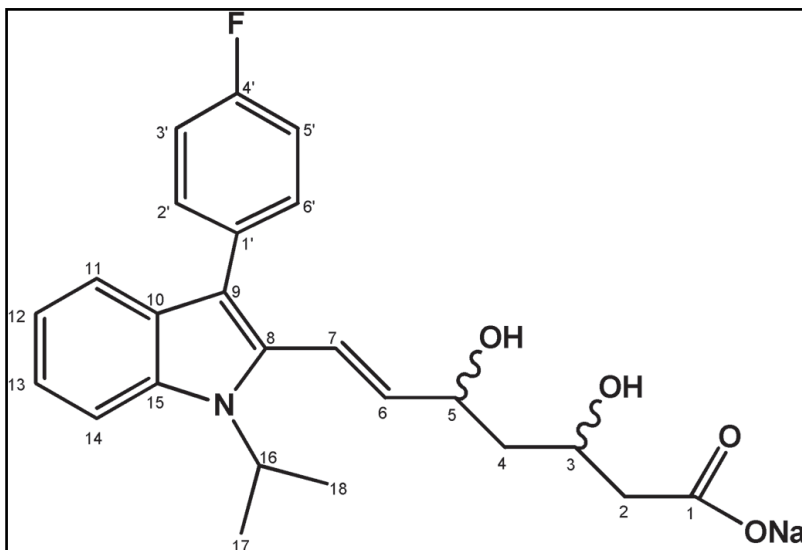


Figura 3 - Estrutura química da Fluvastatina sódica.

No Brasil a FLV é comercializada nas formas farmacêuticas cápsulas (concentrações de 20 e 40 mg) e comprimidos revestidos de liberação prolongada (concentração de 80 mg).

### 2.3 ESTATINAS E PATENTES

De acordo com a Lei 9279/96, de 14/5/1996, conhecida como Lei de Propriedade Industrial (LPI), a definição de patente é: “Um título de propriedade temporária sobre uma invenção outorgado pelo Estado aos inventores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação”. Os seguintes requisitos são necessários para que uma “possível” invenção

seja patenteada: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial (BRASIL, 1996).

A Lei de Inovação Tecnológica N° 10.973, promulgada recentemente, em 2004, e regulamentada em 2005 pelo Decreto N° 5.563, regula os estímulos para a participação de Instituições Científicas e Tecnológicas (ICT's) no processo de inovação, para inovação nas empresas, inventor independente e criação de fundos de investimentos para a inovação. Com o objetivo de fazer gestão estratégica da propriedade intelectual das ICT's brasileiras a lei N° 10.973 é a primeira lei que trata do relacionamento entre universidades, instituições de pesquisa e empresas e da criação dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NIT's) (BRASIL, 2004).

Os NIT's têm como responsabilidade, dentro ou fora das universidades, fornecer informações para os novos inventores sobre os procedimentos legais e a abrangência tecnológica para o depósito e processo de prosseguimento de uma patente (BRASIL, 1996).

Cria-se um ambiente favorável ao desenvolvimento científico tecnológico e econômico do país com o uso e a prática, pelas universidades e centros de pesquisa, do sistema de Propriedade Industrial (PI). O planejamento estratégico das instituições, de diretrizes industriais e políticas públicas pode ser auxiliado pela utilização de dados econômicos juntamente com as patentes, através das informações contidas em seus documentos. Esse sistema permite que a produção intelectual acadêmica e o processo de licenciamento e transferência de tecnologia para o setor empresarial movimentem-se em conjunto (NUNES; OLIVEIRA, 2007).

O sistema de patentes estabelece direitos exclusivos permitindo ao titular que terceiros não façam uso comercial da tecnologia protegida, sem autorização. No entanto, há uma "troca" entre proteção e divulgação de informações no sistema de patentes que vem a contribuir com o desenvolvimento científico e tecnológico. A revelação do processo ou produto é exigida no documento das patentes, pelo proprietário, com descrição suficiente. Portanto, o objeto sob proteção de patente pode ser explorado sem fins comerciais, servindo como fonte de estudo para geração de políticas públicas para a consolidação do sistema nacional de inovação e política industrial e como fonte de inspiração na resolução de problemas no estado da arte e da

técnica pela pesquisa científica das ICT's. A invenção pode ser utilizada por terceiros, sem restrições, após ter o período de exclusividade expirado (SPEZIALI; GUIMARÃES; SINISTERRA, 2012).

As estatinas, por ter suas características químicas e farmacológicas bem estabelecidas, fazem parte de uma classe terapêutica de medicamentos de grande interesse. Seja individualmente ou em associação com outras classes de antilipêmicos, o uso de estatinas tem promovido regressão da aterosclerose vascular, diminuição da incidência de doenças coronárias e maior sobre-vida em pacientes com doença arterial coronariana (EMERTON, 2006; TINETTI, 2008).

Face ao exposto, e levando-se em consideração que os documentos das patentes devem detalhar os processos de síntese e obtenção de diferentes formas cristalinas, para o desenvolvimento do presente trabalho, além do levantamento bibliográfico em publicações científicas, realizou-se a busca de patentes de estatinas, com foco principal na FLV. Objetivou-se a pesquisa de dados sobre o desenvolvimento e/ou descobrimento de substâncias no estado sólido, realizando-se o levantamento bibliográfico de informações sobre as diferentes formas cristalinas possivelmente já identificadas deste fármaco.

Realizou-se pesquisa sobre patentes com diferentes características em relação aos tipos de sólidos utilizados nos processos de produção das diferentes formas cristalinas de FLV. Porém nestas patentes a caracterização no estado sólido está incompleta, principalmente aquelas relacionadas com as propriedades de dissolução. Dentre elas podem ser citadas aquelas que apresentam os processos de produção de formas anidras amorfas (HUANG, 2007), de diferentes formas cristalinas a partir de misturas racêmicas ou enantiômeros isolados (LIFSHITZ-LIRON et al., 2008), de diferentes formas cristalinas e seus hidratos preparados a partir da mistura racêmica do fármaco (VAN DER SCHAAF; BLATTER; SZELAGIEWICZ, 2008; VAN DER SCHAAF; BLATTER; SZELAGIEWICZ, 2006; SURI; SARIN, 2004), dos processos de preparação de formas cristalinas e amorfas a partir de mistura racêmica de FLV (CHAVHAN et al., 2008), da preparação de diferentes formas cristalinas a partir de formas racêmicas (KOLTAI; PINCHASOV; FRENKEL, 2008; RAO et al., 2007; HORVATH, 2000;) e da preparação de diferentes formas cristalinas a partir de diferentes

enantiômeros de FLV (VAN DER SCHAAF, WOLLEB, WOLLEB et al., 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos físico-químicos de FLV no estado sólido e avaliar a estabilidade química e física do fármaco em solução e em suas diferentes formas cristalinas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar distintas formas sólidas de FLV a partir de recristalização em diferentes solventes
- Realizar a caracterização físico-química dos sólidos obtidos
- Desenvolver métodos para avaliar a velocidade de dissolução intrínseca das diferentes formas sólidas de FLV
- Realizar estudo de estabilidade de FLV em solução e no estado sólido



**CAPÍTULO I**  
**Estudos no Estado Sólido**

---





## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 O CONTROLE DE QUALIDADE DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS E O POLIMORFISMO

O progresso tecnológico da indústria farmacêutica tem permitido o desenvolvimento e produção de novos fármacos com o objetivo de atender às necessidades de uma grande parcela da população. As empresas produtoras devem, no entanto, atender às exigências de órgãos oficiais para que sejam realizados ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de fabricação, no intuito de evitar e prevenir os riscos na qualidade e segurança dos produtos comercializados. Tais exigências possuem determinada dinamicidade, e devem receber atualizações com a finalidade da realização de acompanhamento da evolução tecnológica dos processos, novos equipamentos e gerenciamento da qualidade. A garantia da qualidade é, assim, um importante aspecto a ser considerado desde a elaboração do projeto até a liberação do produto final ao consumidor, e é tema de grande relevância na área das ciências farmacêuticas (SWARTZ; KRULL, 1998; WATSON, 1999).

As formas farmacêuticas sólidas são as mais comumente utilizadas em se tratando de administração oral. Em termos mercadológicos, os comprimidos representam a forma farmacêutica mais consumida no mercado de medicamentos e esta forma é a mais adequada para produção em escala industrial possibilitando menor custo efetivo (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Diversos fármacos podem apresentar polimorfismo. Encontra-se na literatura uma grande quantidade de artigos de revisão que reúnem uma extensa lista de fármacos que apresentam polimorfismo (GIRON, 1995; BOTTOM, 1999; BRITAIN, 2011; CHIENG; RADES; AALTONEM 2011). O polimorfismo é definido como sendo, de modo geral, a ocorrência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco (BRITAIN, 1999). Essa definição abrange os termos solvatos/hidratos (pseudopolimorfos) e as formas amorfas, embora Polimorfismo, Solvatos e Sólidos Amorfos possuam significados distintos (FDA, 2007; ICH, 1999).

A caracterização de propriedades no estado sólido é um pré-requisito no desenvolvimento de formas farmacêuticas para assegurar a eficácia, segurança e qualidade do produto final.

Para desenvolvimento racional de medicamentos é essencial a caracterização de formas polimórficas e diferenças no grau de cristalinidade, pois o conhecimento de suas características físicas e físico-químicas é indispensável em estudos de pré-formulação, devido ao impacto de que diferentes formas cristalinas podem exibir distintas propriedades físico-químicas que expressam na terapêutica, mais especificamente alterando a biodisponibilidade (GIRON et al., 2002; STEPHENSON; FORBES; REUTZEL-EDENS, 2001; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999).

A baixa biodisponibilidade de formas sólidas é considerada um desafio durante o processo de desenvolvimento das mesmas. A solubilidade e a estabilidade química são fatores importantes que interferem nesse estágio e tem sido objetivo de diversos estudos (LIPINSKI, et al., 2001; KERNS, 2001; BEVAN, LLOYD, 2000).

As propriedades do estado sólido, em decorrência do curto espaço de tempo entre a descoberta e o processo de desenvolvimento farmacêutico, até pouco tempo não eram consideradas como objetivo de estudo. Entretanto, tais propriedades promovem um profundo impacto na estabilidade química dos sólidos (HUANG, TONG, 2004).

Embora a caracterização física de fármacos no estado sólido venha sendo uma área de grande interesse na farmácia, para alguns fármacos, tais como a FLV, estudos sobre a caracterização do estado sólido e diferentes formas cristalinas não têm sido relatados. A caracterização de fármacos no estado sólido é um passo importante no desenvolvimento farmacêutico, devido às suas implicações física e físico-químicas (densidade, fluxo, estabilidade química, ponto de fusão, solubilidade, etc) que podem afetar significativamente o desempenho da forma farmacêutica. O estudo mais aprofundado sobre a forma como as características do estado sólido podem influenciar propriedades como solubilidade e estabilidade de uma substância se torna fundamental para a definição de critérios de avaliação de formas sólidas (SORRENTI, 2012).

Papageorgiou e colaboradores (2009) estudaram a estabilidade física e química de dispersões sólidas de diferentes polímeros contendo FLV. Através da caracterização realizada por diferentes técnicas, entre elas DSC e DRX, os autores constataram uma amorfização do fármaco em todas as

dispersões sólidas e evidentes melhorias na estabilidade física e química através da interação fármaco-polímero. Em outro estudo, Panda e colaboradores (2009) também avaliaram a estabilidade da interação entre FLV e polímeros, intercalando duas camadas de hidróxido com o fármaco através do método de coprecipitação. No entanto, os padrões de raios-x de FLV relatados nesses estudos apresentam diferentes estruturas cristalinas. Portanto, esses resultados são válidos apenas para essas formas cristalinas, e a performance dos produtos finais pode ser diferente dependendo da estrutura cristalina de FLV utilizada. É válido ressaltar que foram registradas muitas patentes sobre as formas cristalinas de FLV, no entanto a descrição da caracterização do estado sólido dessas formas está incompleta, principalmente aquelas relacionadas às propriedades de dissolução. Face ao exposto, no presente trabalho propôs-se a caracterização de FLV no estado sólido objetivando o estudo do polimorfismo deste fármaco baseando-se nos relatos de diversas patentes sobre a síntese de diferentes polimorfos de FLV (PAPAGEORGIOU, 2009; PANDA, DRIVASTANA, BAHADUR, 2009; VAN DER SCHAAF, BLATTER. SZELAGIEWICZ, 2008; CHAVHAN et al., 2008; LIIFSHITZ-LIRON et al., 2008; HUANG, 2007; VAN DER SCHAAF, BLATTER, SZELAGIEWICZ, 2006; VAN DER SCHAAF, et al., 2005; HORWATH, 2000).

## 4.2 A TEORIA DO ESTADO SÓLIDO E O POLIMORFISMO EM FÁRMACOS

### 4.2.1 Propriedades Cristalinas

Os compostos sólidos, orgânicos e inorgânicos, podem existir em mais de uma forma cristalina, sendo essa propriedade conhecida como polimorfismo (THRELFALL, 1995; BRITTAIN, 1999; BERNSTEIN, DAVEY, HENCK, 1999; BYRN, 1999; OCHOA, ALEGRE, DURÁN, 2001; WELLS, 2005; CAIRA et al., 2007; CUI, 2007).

Como qualquer composto químico, os fármacos – também chamados de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) – podem se apresentar como gases, líquidos ou sólidos. No caso dos compostos sólidos, estes podem ser sólidos amorfos ou cristalinos. Os sólidos amorfos possuem seus átomos ou

moléculas arranjadas de forma aleatória não ocorrendo a formação de cristais devido ao grau de desordem que possuem a nível molecular. No entanto, os sólidos cristalinos caracterizam-se pela repetição espacial tridimensional de suas unidades estruturais, que se encontram dispostas em padrões geométricos fixos, formando arranjos cristalinos ordenados de suas moléculas. (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001; HANCOCK, YORK, ROWE, 1997; WILLART, DESCAMPS, 2008; SINKO, TAYLOR, 2008).

A habilidade de uma substância química em cristalizar-se em mais de uma forma cristalina estabelece o conceito de polimorfismo. Trata-se de cristais que se diferenciam pelo arranjo e/ou conformação dos átomos ou moléculas na rede cristalina, sendo que cada polimorfo apresenta uma orientação particular. Tais cristais são constituídos de unidades estruturais localizadas no espaço de forma tridimensional, onde a configuração espacial dos átomos e/ou moléculas define a forma e volume, necessários à geração do cristal (GEOFF et al., 2009; FLORENCE, ATWOOD, 2003; VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001).

Polimorfos cristalinos têm a mesma composição química, mas diferentes estruturas cristalinas que podem modificar ou proporcionar diferentes propriedades do estado sólido. Desta forma, a cristalização representa um papel importante no controle da forma cristalina e distribuição de tamanho destes cristais (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001; BYRN, PFEIFFE, STOWELL, 1999).

As substâncias sólidas, orgânicas e inorgânicas, apresentam-se de diferentes formas, podendo estar na forma cristalina (que possuem moléculas e/ou átomos em arranjos cristalinos ordenados) ou amorfa (que não possuem arranjo molecular). Tais sólidos podem ser classificados como sólidos monocomponentes (que possuem uma única substância) ou multicomponentes (que possuem mais de uma substância) (HILFIKER, 2006).

Os sólidos monocomponentes podem ser classificados como anidros, e os multicomponentes como: solvatos, sais e co-cristais.

a) Monocomponentes:

- Anidros: contém uma única molécula do fármaco em sua estrutura cristalina. Os dessolvatos

isofórmicos constituem um caso particular dos sólidos anidros, já que sofreram um processo de dessolvatação perdendo as moléculas de solvente, porém conservando parte da rede cristalina do solvato precursor.

b) Multicomponentes:

- Solvatos: contém moléculas do fármaco e de solvente incorporados na estrutura. Os Hidratos são a subclasse mais importante dos solvatos.
- Sais: contém o fármaco protonado (ou não) e o seu contra-íon correspondente incorporados na estrutura cristalina.
- Co-Cristais: contém moléculas de diferentes fármacos (ou de um único fármaco e outras substâncias não voláteis) incorporados na estrutura cristalina. (SHAN, ZAWOROTKO, 2008; ULLMAN, BOUTELLIER, 2008).

As diferentes formas cristalinas podem apresentar diferenças significativas em suas propriedades físicas, se comportando como entidades químicas diferentes. Dentre as características que podem apresentar diferenças significativas para diferentes polimorfos de um mesmo composto encontram-se: solubilidade, processabilidade e estabilidade física e química. Alterações nas propriedades biofarmacêuticas, na velocidade de dissolução e/ou biodisponibilidade, e na estabilidade resultam das modificações que os cristais podem sofrer durante os processos de síntese, formulação ou durante as condições normais de armazenamento dos fármacos (AGUIAR, GEMAL, GIL, 1999; BRITTAİN, 1999; CARSTENSEN, RHODES, 2000; SINGHAL, CURATOLO, 2004). Diferentes polimorfos, frequentemente, apresentam diferentes propriedades como densidade, dureza, compressibilidade, morfologia do cristal, propriedades de fluxo, índice de refração, ponto de fusão, entalpia de fusão, pressão de vapor, solubilidade e velocidade de dissolução (VIPAGUNTA, BRITTAİN, GRANT, 2001; WELLS, 2005).

Para a produção de medicamentos genéricos o polimorfo selecionado para determinada formulação, além da estabilidade

física e eficácia terapêutica desejada, deve ainda cumprir com critérios de bioequivalência (STORPIRTIS, CONSIGLIERI, 1995). Da mesma forma que são encontrados medicamentos produzidos com polimorfos diferentes e que são equivalentes do ponto de vista terapêutico, também se encontram medicamentos que, ao ser utilizado um polimorfo diferente, o medicamento pode apresentar inatividade, toxicidade ou ter uma eficácia terapêutica inadequada. Como exemplos de graves implicações terapêuticas no uso de diferentes polimorfos para a produção de medicamentos pode-se citar os casos do palmitato de cloranfenicol, carbamazepina e ritonavir (GRZESIAK et al., 2003; BAUER et al., 2001; KOBAYASHI, et al., 2000; CHEMBURKAR et al., 2000; MEYER et al., 1992; KAHELA, et al., 1983; AGUIAR, 1967).

A forma B do Palmitato de Cloranfenicol possui atividade terapêutica 8 vezes maior que a Forma A, o que levou a Farmacopeia Americana (USP) a adotar a quantificação da forma A, em um limite de 10%, como critério de especificação em sua monografia. No caso da Carbamazepina, após a ocorrência de mortes em função do uso deste fármaco na década de 80 nos Estados Unidos, o órgão regulador daquele país, Food and Drug Administration (FDA), iniciou uma série de estudos sobre o comportamento deste fármaco no estado sólido. Como decorrência, a USP adicionou o ensaio de Difração de Raios X de Pó (DRX de Pó) na monografia do fármaco, garantindo, dessa forma, que o polimorfo a ser utilizado no desenvolvimento das formas farmacêuticas seja a forma p-monoclínica. Já o fármaco Ritonavir, após estar sendo comercializado por dois anos, teve que ser retirado do mercado, pois apresentou problemas na dissolução de vários lotes. A diminuição da dissolução deu-se em função do aparecimento de uma segunda forma cristalina de ritonavir (Forma II), a qual não havia sido encontrada durante o processo de desenvolvimento.

Autoridades reguladoras de diversos países, principalmente da América do Norte e Europa, foram motivadas a emitir resoluções para melhorar o controle do polimorfismo e diminuir a ocorrência de alterações na forma sólida dos fármacos após o aparecimento de problemas como os mencionados.

O polimorfismo pode ocorrer em duas diferentes formas: o polimorfismo por empacotamento e o polimorfismo conformacional. Por empacotamento, nas formas cristalinas, as

moléculas rígidas em conformação uniforme, se empacotam em diferentes arranjos. Já, no polimorfismo conformacional, nas formas cristalinas, as moléculas flexíveis com diferentes conformações, se empacotam em arranjos diferentes. Como exemplo de polimorfismo por empacotamento pode-se citar o paracetamol (BOLDYREVA et al., 2000), assim como o ritonavir é um exemplo de polimorfismo conformacional (BAUER, 2001).

Diferenças nas propriedades físicas de várias formas cristalinas dos fármacos têm importantes efeitos no desenvolvimento das formas farmacêuticas sólidas, enquanto diferenças na solubilidade podem ter implicações na absorção da forma ativa de um fármaco e interferir na dosagem correta do mesmo, por interferir na velocidade de dissolução (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001). Diferentes polimorfos de um fármaco podem apresentar diferentes velocidades de dissolução, embora alguns não apresentem diferença significativa. Porém, quando a diferença da velocidade de dissolução é considerada significativa, os medicamentos podem apresentar menor atividade, inatividade ou ainda toxicidade, quando há relação entre a dissolução e sua atividade farmacológica. A velocidade de dissolução dos polimorfos vem sendo apresentada como importante parâmetro para garantir a eficácia terapêutica das formas farmacêuticas sólidas (SHETE et al., 2010; SEHIC et al., 2010). O FDA recomenda que, ao serem detectadas diferenças nas solubilidades aparentes de diferentes formas polimórficas, deve-se dar enfoque ao potencial efeito que estas diferenças podem ter sobre a biodisponibilidade (BD) e bioequivalência (BE) da forma farmacêutica (FDA, 2007).

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA NO ESTADO SÓLIDO

A caracterização físico-química de fármacos no estado sólido tem se tornado uma área de grande interesse na farmácia, e tem sido objeto de diversos trabalhos nos últimos anos (VILA JATO, 2001; BRITAIN, 1999; CARSTENSEN, RHODES, 2000; GAMBERINI et al., 2006; CUFFINI et al., 2007; MARTINO et al., 2007; PALACIO et al., 2007; GHUGARE et al., 2010; FETH et al., 2011; SORRENTI et al., 2012; BOURICH et al., 2012-).

Para realizar estudos de caracterização no estado sólido de compostos orgânicos, especialmente de fármacos, há a

necessidade da utilização de diferentes técnicas analíticas, as quais fornecem valiosas informações e se complementam sobre diferentes propriedades ou características desses materiais. Existem técnicas que fornecem informações sobre propriedades estruturais, espectroscópicas, térmicas, morfológicas, aquelas relacionadas à dissolução e a distribuição do tamanho das partículas dos sólidos analisados. Tais técnicas agrupam-se de acordo com a propriedade ou informação que oferecem, conforme descrição a seguir:

- a) **Determinação de Estruturas Cristalinas:** Difração de Raios X (DRX) de pó, de monocristais com fontes convencionais e/ou radiação síncrotron (STEPHENSON, FORBES, REUTZEL-EDENS, 2001; BRITAIN, 2001; STEPHENSON, 2000);
- b) **Estudos das propriedades térmicas:** Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) (CLAS, DALTON, HANCOCK, 1999; GIRON, 1995);
- c) **Caracterização Molecular e interações intra e intermoleculares:** Espectroscopias: Infra-Vermelho (FT-IR) e Raman, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em sólido (GEPPI et al., 2008; HARRIS, 2007; PEREZ et al., 2005; BALCHIN et al., 2005; TISHMACK, BUGAY, BYRN, 2003; REUTZEL-EDENS, BUSH, 2002; BUGAY, 2001; BRITAIN, 1997);
- d) **Caracterização Morfológica:** Microscopia: Óptica (MO) e Eletrônica de Varredura (MEV) (HALEBLIAN, 1975);
- e) **Determinação do Tamanho e Distribuição de Partículas:** Difração de Laser (BYRN, 1999).

Para a obtenção da caracterização de fármacos no estado sólido, devem ser avaliadas as características da amostra e, se necessário, fazer uso da combinação de diferentes técnicas. A seguir serão destacadas as técnicas mais utilizadas.



### 4.3.1 Difração de Raios-X

A DRX, de monocristal e de pó, é reconhecida pelo FDA, em seu Guia para Indústrias Farmacêuticas, como técnicas de referência para o estudo e identificação de polimorfismo (FDA, 2007).

O fenômeno da difração é originado a partir da interação de um feixe de Raios x com os elétrons dos átomos presentes no cristal (ou amostra cristalina). Nos materiais cristalinos, os átomos e as moléculas se ordenam em uma rede tridimensional que se repete periodicamente, denominada estrutura cristalina. Em consequência desse arranjo atômico ou molecular periódico, ocorre que, em todas as direções, é possível construir conjuntos de planos que são paralelos entre si e que estão igualmente espaçados por distâncias interplanares ( $d$ ) de mesma ordem de longitude que a longitude da onda dos Raios X ( $\lambda$ ). Os Raios X são difratados pelos cristais apenas quando o ângulo entre o raio e o conjunto de planos no cristal satisfazem a Lei de Bragg:  $n\lambda = 2d \sin \theta$ , onde  $\theta$  é o ângulo entre o raio e o plano (ângulo de difração) e  $n$  é um número inteiro que representa a ordem de difração. Logo, a difração de raios-X baseia-se na propriedade intrínseca de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção dos raios-X difratados sobre ele. O ângulo de desvio da radiação é único para cada plano do cristal, ou seja, é específico para cada plano, pois ocorre desvio em ângulos bem definidos, o que permite então a caracterização (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; GIACOVAZZO, et al., 2002; JENKINS, SNYDER, 1996).

Através do ensaio de difração de raios-X de monocristal pode-se conhecer a estrutura cristalina do cristal, mas para isso quase sempre se faz necessário obter um monocristal de qualidade adequada. Com esta técnica há determinam-se os parâmetros métricos que caracterizam a rede cristalina, sendo eles: Parâmetros da célula unitária (dimensões  $a, b, c$ ; ângulos  $\alpha, \beta, \delta$ ); Posições atômicas das moléculas independentes ( $x, y, z$ ) e Grupo espacial (existem 230 grupos espaciais cada um contendo um conjunto específico de condições de simetria e descrição matemática da simetria cristalográfica;). Tanto as interações intra e intermoleculares, quanto a conformação e o empacotamento das moléculas, podem ser analisadas logo que se tenha determinada a estrutura cristalina (SKOOG, HOLLER,

NIEMAN, 2002; GIACOVAZZO, et al., 2002; JENKINS, SNYDER, 1996).

Levando-se em consideração o fato de se conseguir determinar todos os parâmetros mencionados, considera-se que o ensaio de difração de raios x de monocristal seja a técnica mais adequada para determinar a estrutura interna de um cristal, sendo dessa forma considerada a técnica de referência para o estudo do polimorfismo. (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; GIACOVAZZO, et al., 2002; JENKINS, SNYDER, 1996).

Praticamente todos os insumos farmacêuticos cristalinos utilizados pelas indústrias atualmente encontram-se na forma de pós, fazendo com que esta técnica seja pouco utilizada. Apenas nas etapas de pesquisa e desenvolvimento que ocorre a produção de monocristais, e ainda em pequena escala. Utiliza-se então, como alternativa, a difração de raios X de pó. Técnica que se encontra mais acessível para o uso em controle de qualidade industrial, pois não há necessidade do uso de grande quantidade do insumo recebido (dependendo do acessório disponível e da amostra utiliza-se entre 50 e 500mg). (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; GIACOVAZZO, et al., 2002; JENKINS, SNYDER, 1996).

Cada substância possui um difratograma característico e distinto. Tais difratogramas são formados por um conjunto de linhas ou picos, apresentando diferentes intensidades e posições (distâncias interplanares “d”). As posições dos picos são essencialmente fixas, para uma mesma substância, e características, porém, as intensidades podem variar um pouco entre diferentes amostras, dependendo do método de preparação da amostra e condições instrumentais. Portanto, tendo-se como objetivo a identificação de diferentes fases cristalinas, as posições dos picos devem ser os dados principais a serem avaliados. Já, devido à orientação preferencial, as intensidades dos picos são consideradas para avaliações semi-qualitativas. (BRITAIN, 2001). Cada estrutura cristalina apresenta uma composição química definida e gera um único conjunto de reflexões, que está associado a um único padrão característico de DRX, que vem a ser considerado como impressão digital (GIACOVAZZO, et al., 2002; JENKINS, SNYDER, 1996).

Os sólidos amorfos não possuem uma organização definida, sendo que a orientação das moléculas é aleatória não

obecendo qualquer regra de simetria. Em DRX de pó pode-se avaliar a cristalinidade de uma substância, e devido ao fato de os átomos de um sólido amorfo não estarem em planos paralelos as reflexões obtidas são muito difusas, e por esse motivo não produzem um padrão de DRX definido. Dessa forma ao passo que o caos molecular aumenta, as reflexões finas vão se perdendo, dando lugar a formação de halos largos característicos de sólidos amorfos GIACOVAZZO, et al., 2002; JENKINS, SNYDER, 1996).

#### **4.3.2 Técnicas Termoanalíticas**

Dentre as técnicas termoanalíticas mais difundidas e utilizadas encontram-se a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), a Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Termogravimetria (TG). Tais técnicas fazem parte de um conjunto que permite medir mudanças que ocorrem nas propriedades físicas ou químicas de uma substância enquanto a mesma é submetida a uma programação controlada de temperatura em função do tempo e/ou temperatura (FORD, TIMMINS, 1989).

Podem ser realizados diversos estudos utilizando técnicas termoanalíticas, os quais possuem uma série de aplicações, entre eles pode-se citar: cristalização, compatibilidade, degradação, dessolvatação, diagrama de fases, estabilidade, evaporação de voláteis, fusão, interação, polimorfismo, pureza, reação química e sublimação (HAINES, 1995).

A prática de acoplamento de técnicas está sendo bastante utilizada para as técnicas termoanalíticas. São encontrados atualmente equipamentos simultâneos (ex.: calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial e termomicroscopia) e ainda equipamentos acoplados com outras técnicas analíticas (ex.: termogravimetria acoplada a espectroscopia de massas, termogravimetria acoplada a espectroscopia de infravermelho) (MOTHÉ, AZEVEDO, 2009). Nos estudos de polimorfismo pode-se destacar o uso das seguintes técnicas:

##### **a) Calorimetria exploratória diferencial (DSC):**

DSC é uma técnica que permite medir a diferença de fluxo calórico entre uma determinada amostra e um padrão de

referência inerte, em função do tempo ou da temperatura. A amostra e o padrão inerte são submetidos a uma mesma razão de aquecimento, sendo registrada a quantidade de calor necessária para manter o aquecimento. Quando ocorrer uma variação na quantidade de calor fornecida ao sistema em teste ( $\Delta H$ ) é indicado uma transformação térmica na amostra testada (FORD, TIMMINS, 1989; BROWN et al., 1999). Como resultado dessa análise obtém-se um gráfico no qual está representado o fluxo de calor em função da temperatura ou tempo, denominado Curva DSC. Durante os processos de aquecimento ou resfriamento controlados a amostra pode sofrer alterações físicas ou químicas. Tais alterações refletem na linha de base da curva DSC, formando os eventos endotérmicos ou exotérmicos. Os eventos endotérmicos (endotermas) representam os processos nos quais a amostra absorve calor, como por exemplo: fusão, ebulição, sublimação, transições de fase, dessolvatação, degradação química, etc. Já as exotermas representam processos onde a amostra libera calor, entre elas: cristalização, decomposição oxidativa, etc. (GIRON et al., 1995).

A calorimetria exploratória diferencial demonstra grande aplicabilidade para materiais polimórficos. As curvas de DSC auxiliam na identificação de transformações de fase, caracterização de hidratos e sistemas solvatados, assim como na previsão de estabilidade de compostos (BRITTAİN, 1999). No caso dos polimorfos a resposta DSC mais importante é a fusão, já que os polimorfos podem exibir diferentes pontos e entalpias ( $\Delta H$ ) de fusão. Também podem indicar transformações entre polimorfos através da presença de pequenos eventos endo ou exotérmicos. As formas metaestáveis podem transformar-se durante a corrida de DSC, que resultarão em absorção ou emissão de energia. Portanto, DSC torna-se uma importante técnica a ser utilizada para prover informações sobre a existência de polimorfos e as transformações que ocorrem entre eles, permitindo detalhar as relações energéticas entre os diferentes polimorfos de um mesmo composto (GIRON et al., 1995; FORD, TIMMINS, 1989; KUHNERT-BRANDSTATTER, 1971).

#### b) Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica na qual a variação de massa de uma amostra é determinada em

função da temperatura e/ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma variação controlada de temperatura (FORD, TIMMINS, 1989). É um ensaio amplamente utilizado na área farmacêutica principalmente nos estudos dos processos de dessolvatação e decomposição de IFAs e excipientes. A curva termogravimétrica (TG) é o resultado obtido com esta análise. Cada composto analisado possui uma curva característica em virtude de reações físico-químicas ou mudanças de estado que ocorrem ao longo de uma faixa definida de temperatura. O resultado obtido se dá em função de variações de massa que resultam de rupturas e/ou formação de diferentes ligações físicas e químicas e ainda mudanças de estado da amostra, ocorrendo a liberação de produtos voláteis ou formação de produtos de maior massa (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; FORD, TIMMINS, 1989).

As curvas TG detectam as perdas de massa resultantes de muitos fenômenos físicos e químicos. Entre os físicos podem ser citados: desidratação, vaporização, absorção, sublimação, adsorção, dessorção. Já entre os químicos: quimiossorção, desolvatação, decomposição, degradação oxidativa, degradação redutiva, reações em estado sólido (GIRON et al., 1995).

Quando utilizada junto à análise DSC, as curvas TG se tornam muito importantes, pois a combinação das duas técnicas fornece uma melhor visualização dos eventos térmicos. Como exemplo pede-se citar os processos de dessolvatação e as reações de decomposição, os quais estão associados a perdas de massa, enquanto que as transformações sólido-sólido e sólido-líquido não apresentam tais perdas nas curvas TG.

A determinação do conteúdo de água e/ou solvente presente em determinadas amostras vem sendo realizada com o uso desta técnica. É comum se realizar a derivação da curva TG, obtendo-se a curva DTG, a qual permite uma melhor visualização das perdas de massa, pois há a formação de picos que identificam esses eventos (CLAS, DALTON, HANCOCK, 1999).

### **4.3.3 Espectroscopias**

De uma maneira geral, as técnicas espectroscópicas baseiam-se no princípio das diferentes interações que as moléculas e átomos podem ter com a radiação eletromagnética. Dependendo da intensidade e do comprimento de onda da

radiação utilizada essas interações revelam informações estruturais e termodinâmicas de forma qualitativa e/ou quantitativa. As técnicas espectroscópicas possibilitam análises rápidas e diretas. Destaca-se a importância destas técnicas devido à possibilidade de realizar a identificação de diferentes compostos simultaneamente (IBÁÑEZ, CIFUENTES, 2001). Em virtude da capacidade de identificação molecular e caracterização de interações inter e intramoleculares, as técnicas espectroscópicas como a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) e a Ressonância Magnética Nuclear no estado Sólido (RMNes), tem sido amplamente utilizadas nas áreas química e farmacêutica (CHIENG, RADES, AALTONEM, 2011).

Para a identificação de polimorfos as técnicas espectroscópicas vibracionais (Infravermelho e Raman) têm grande utilidade, pois as suas diferentes estruturas cristalinas afetam as vibrações moleculares, enquanto que a identificação realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) ocorre em virtude das diferentes interações de deslocamento químico do mesmo átomo, propiciada pelas alterações no ambiente local dos núcleos, que permitem a identificação (BUGAY, 2001; TISHMACK, BUGAY, BYRN, 2003; HARRIS, 2006).

a) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho é baseada na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do infravermelho, provocando transições vibracionais e rotacionais. Dessa forma, pode-se medir a absorção desta radiação pela molécula do sólido analisado, que corresponde a um determinado momento dipolar, levando a identificação do tipo de ligação presente na estrutura (SKOOG; HOLLER, NIEMAN, 2002). Esta técnica torna-se útil para a caracterização de polimorfos, pois as ligações intramoleculares de hidrogênio (afetando as vibrações O-H, N-H ou C=O), frequentemente diferem entre as formas das estruturas cristalinas e os grupos funcionais afetados (KALINKOVA, 1999; BUGAY, 2001).

Atualmente os equipamentos disponíveis fornecem espectros de forma mais rápida e com maior sensibilidade em

virtude de possuírem um interferômetro ao invés de um monocromador para guiar a luz infravermelha. Com esse advento os equipamentos passaram a ser chamados de espectrômetros de infravermelho por Transformada de Fourier. A transformada de Fourier (FT-IR) utiliza-se do mesmo princípio da espectroscopia em infravermelho diferindo apenas no domínio onde o espectro é mensurado promovendo uma conversão do domínio do tempo para o domínio da frequência (WARTEWIG, REINHARD,; NEUBERT, 2005).

Parte da radiação infravermelha emitida sobre um determinado sólido é absorvida pela molécula promovendo movimentos de torção, rotação e vibração dos seus átomos proporcionando a identificação de grupamentos funcionais em comprimentos de onda característicos (BUGAY, 2001).

A faixa espectral da radiação de infravermelho compreende três regiões: Infravermelho distante ( $10$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ), Infravermelho médio ( $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ) e Infravermelho próximo ( $4000$  e  $20.000\text{ cm}^{-1}$ ) (SHAW, MANTSCH, 2000; BARBOSA, 2007).

O infravermelho distante não tem demonstrado aplicabilidades para análise de sólidos orgânicos. Ao passo que, o infravermelho médio é bastante difundido na área farmacêutica. Essa região do infravermelho possui bandas de absorção dos grupamentos funcionais que são precisamente conhecidas, sendo por isso muito utilizada na identificação química de muitos insumos farmacêuticos. Para utilizar o infravermelho próximo, é necessário fazer uso da quimiometria, visando uma maior robustez das análises, pois, embora análises nessa região possuam maior versatilidade e rapidez, também há menor resolução e sensibilidade (BUGAY, 2001).

#### b) Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de alta resolução que permite a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, pois fornece informações químicas e estruturais do analito. A técnica é baseada na dispersão inelástica, sendo útil em uma ampla faixa espectral, desde o ultravioleta até o infravermelho. Na região do infravermelho se observa uma maior utilização para a caracterização dos sólidos orgânicos (BUGAY, 2001).

A técnica consiste em incidir luz monocromática, de frequência  $V_0$ , sobre a amostra a qual se deseja determinar as características moleculares, e examinar a luz dispersa pela mesma. A maior parte da luz dispersa possui a mesma frequência que a luz incidente, porém existe uma pequena fração de luz dispersa que apresenta uma troca de frequência resultante da interação com a amostra, denominadas frequências Raman. Tais frequências são características da natureza química e do estado físico da amostra e independentes da radiação incidente (SALA, 1995).

As técnicas de espectroscopia no infravermelho e Raman têm sido consideradas complementares em diversas situações devido às diferenças que elas apresentam. No infravermelho se observa maior intensidade para transições de grupos polares e vibrações assimétricas, enquanto que na espectroscopia Raman uma maior intensidade é observada nas transições das ligações apolares e nas vibrações simétricas (BUGAY, 2001). Embora as informações químicas fornecidas pela espectroscopia Raman sejam similares às fornecidas pelo FT-IR, a técnica quando aplicada a estudos de polimorfismo apresenta diversas vantagens, como por exemplo, a quantificação de fases polimórficas. A quantificação de polimorfos da carbamazepina, meprobamate, acetaminofeno, famotidina, fenilbutazona, sulfametrol, manitol e sorbitol em medicamentos disponíveis comercialmente demonstrou que a espectroscopia Raman é uma técnica rápida e eficiente (AUER; GRIESSER, SAWATZKI, 2003).

### c) Ressonância Magnética Nuclear

Desde a primeira identificação de sinais em um espectro em 1945 por Bloch, Purcell e colaboradores, a utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), bem como a versatilidade dos equipamentos tem avançado consideravelmente. A ressonância magnética nuclear possibilita uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas dos núcleos e das moléculas, pois está relacionada com as características intrínsecas dos spins nucleares (GLADDEN, 1994).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseia-se na medida da absorção da radiação eletromagnética



na região de radio frequência (4 – 900 MHz) do espectro eletromagnético, que resulta em modificação na orientação do spin do núcleo quando submetido a um campo magnético (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

A técnica consiste em submeter um núcleo, cujo spin seja diferente de zero, a um campo magnético e detectar o seu momento magnético, ou sua ressonância magnética. Como cada núcleo tem um momento diferente, pode-se definir que tipo de ligação química aquele núcleo está realizando. Isto só ocorre com isótopos de números ímpares de prótons e/ou nêutrons. Entre os núcleos com spin diferente de zero, o isótopo do  $^1\text{H}$  é o mais utilizado, devido a sua alta abundância isotópica, de 99,98%. No entanto estudos com  $^{13}\text{C}$  têm despertado um grande interesse, pelo fato de que a pequena abundância isotópica do núcleo  $^{13}\text{C}$  elimina as complicações relacionadas à multiplicidade de sinais originária de acoplamentos  $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ . Dessa forma, um único sinal de ressonância será observado no espectro para cada carbono presente na amostra. Os isótopos mais estudados são o próton ( $^1\text{H}$ ), carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) e fósforo 31 ( $^{31}\text{P}$ ) (SILVERSTEIN, WEBSTER, 1997; VIPPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001; SKOOG; HOLLER, NIEMAN, 2002; CAYTAN et al., 2007).

As condições de medida do espectro de RMN de uma amostra no estado sólido são diferentes das condições da mesma em solução. Nos espectros de RMN de moléculas em solução (RMN líquido) as constantes de acoplamento escalares, da ordem de Hz, são os fatores determinantes dos desdobramentos observados, enquanto que nos espectros de RMN no estado sólido as interações dominantes são os acoplamentos referentes às interações dipolares, na ordem de kHz (BAI, WANG, DYBOWSKI, 2010).

No estado sólido existem interações internas e externas, dipolares e desacoplamentos químicos anisotrópicos, que para obter sinais de ressonância estreitos, devem ser minimizados. As fortes interações dipolares H-H presentes nas moléculas no estado sólido dificultam a obtenção de espectros de hidrogênio. Na RMN no estado sólido utiliza-se o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, desacoplando os prótons dos núcleos de carbono simultaneamente, em rotação ao ângulo mágico e polarização cruzada, propiciando a produção de espectros de alta resolução e mais fáceis de interpretar (BAI, WANG, DYBOWSKI, 2010).

Vários fatores podem influenciar os valores de deslocamentos químicos de carbono-13, tais como efeitos iônicos, ligações de hidrogênio, empacotamento do cristal, mudanças conformacionais, entre outros (HANGMAN, LEE, BRITT, 1997; ZHENG et al., 1997).

A obtenção de espectros de RMN de alta resolução de amostras sólidas medidos em espectrômetro para amostras líquidas conduz a espectros largos e inexploráveis, devido ao fato de que no estado sólido há uma diminuição dos movimentos moleculares, que em solução, permitem na maior parte dos casos considerar como zero as interações entre os dipolos nucleares.

No estado sólido a espectroscopia de ressonância magnética nuclear pode ser utilizada para o estudo de formas cristalinas, bem como no aspecto estrutural de cada forma cristalina como em seu aspecto dinâmico. Esta técnica apresenta relevantes aplicações na dedução das variações polimórficas, principalmente no polimorfismo conformacional (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT et al., 2001), e vem sendo muito utilizada pela indústria farmacêutica, nos últimos anos, tendo em vista que cerca de 90% dos fármacos são comercializados no estado sólido (PARK et al., 2010; KIM, GAO, BURGESS, 2009; AGUIAR, GEMAL, GIL; 1999; LI et al., 1996; BRITAIN, et al., 1988).

A possibilidade de detectar diferenças conformacionais entre o estado sólido e em solução, com o emprego de uma mesma técnica de análise, é promissora, e pode ter uma importante aplicação quando se estudam fármacos. No entanto, a comparação dos espectros de RMN<sup>13</sup>C no estado sólido com os espectros obtidos em solução não tem sido sistematicamente explorada (AGUIAR, GEMAL, GIL; 1999).

#### **4.3.4 Microscopia**

A microscopia, classificada em óptica e eletrônica, é uma técnica que possibilita uma avaliação qualitativa e quantitativa de cristais através da observação da homogeneidade e determinação do tamanho e forma de partículas. Tanto a microscopia óptica quanto a eletrônica fornecem informações acerca das formas dos cristais ou hábitos das estruturas cristalinas. A diferença entre os dois tipos de microscopia se

encontra na faixa de magnificação, onde a óptica é mais limitada, ficando a cerca de 2000x, e a eletrônica pode ser empregada em uma faixa mais elevada, a cerca de 100.000X. As duas técnicas tem sido utilizadas com eficácia da caracterização de materiais polimórficos e solvatos, apesar da diferença nas faixas de magnificação (BRITTAIN, 1999).

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura atualmente é bastante utilizada para o estudo das características de superfície (polimorfismo), morfológicas (diferentes hábitos cristalinos) e de interações partícula-partícula. A MEV baseia-se na irradiação de um fino feixe de elétrons sobre a amostra, a qual geralmente é coberta por ouro ou grafite, com o intuito de torná-la condutora, evitando que a mesma se torne carregada eletrostaticamente (BYRN; PFEIFFE, STOWELL, 1999).

A interação que ocorre entre o feixe de elétrons e a superfície da amostra provoca a emissão de uma série de radiações, como: elétrons secundários, elétrons retrodispersados, elétrons Auger, fótons, raios-X característicos, etc. Como resultado desta técnica se obtém imagens de alta resolução da topografia da superfície da amostra analisada, que é produzida através da detecção dos elétrons secundários (GOODHEW, HUMPHREYS, BEANLAND, 2000; WOOD, 1977).

A MEV fornece magnificações muito superiores as da Microscopia ótica, podendo atingir cerca de 300.000 vezes o aumento. Esta técnica é muito importante para a caracterização e compreensão das diferentes propriedades dos polimorfos que envolvem diferentes hábitos cristalinos e/ou efeitos superficiais (WOOD GOODHEW, HUMPHREYS, BEANLAND, 2000; WOOD, 1977).

#### **4.3.5 Dissolução Intrínseca**

O conhecimento da dissolução de um fármaco torna-se uma importante ferramenta na pesquisa, desenvolvimento de produtos e controle de qualidade de fármacos, uma vez que alguns fatores relacionados ao fármaco podem interferir na cinética de dissolução e na biodisponibilidade de formas farmacêuticas. Dentre os fatores mencionados, podem ser

citados: tamanho de partícula e sua distribuição, higroscopicidade, cristalinidade, amorfismo, polimorfismo, pka, coeficiente de partição e solubilidade (USP 35, 2012).

Através da dissolução intrínseca podem-se avaliar diferenças no comportamento dos polimorfos de um dado fármaco, diferentes lotes de um mesmo fármaco e iguais ou diferentes polimorfos provenientes de diferentes fabricantes. Sendo possível, dessa forma, estudar diferenças na cristalização e efeitos do micronizado que modificam e impactam as características de ordem/desordem nas partículas. Dessa forma a VDI permite discriminar e estudar algumas propriedades físico-químicas do estado sólido, polimorfismo, e seu impacto na VD sem interferência de outras características como tamanho, hábito das partículas e sua área superficial (YU et al., 2004; VIEGAS et al., 2001).

A velocidade de dissolução (VD) de um fármaco é definida como a quantidade ou massa (m), ou concentração (C) do mesmo, que se dissolve por unidade de tempo (t) sob condições padronizadas da interface sólido-líquido, temperatura e composição do meio, ou seja:

$$VD = \frac{dm}{dt} = K A (S_{ap} - C_t)$$

Equação de Noyes-Whitney

Onde:

A = área superficial de dissolução

Sap = solubilidade aparente

Ct = concentração de soluto no meio de dissolução no tempo t

K = constante relacionada à hidrodinâmica;  $K = D / VhD$ ; onde: D = coeficiente de difusão do soluto, h = espessura da camada de difusão e V = volume de meio de dissolução

A VD de um sólido é, normalmente, proporcional à área superficial umedecida (A), que, à medida que o sólido vai dissolvendo, tem sua extensão diminuída. Porém, se a área permanece constante e a VD se divide pela área, nas condições sink, obtém-se a Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI):

$$VDI = \frac{dm}{dt} \underset{t \rightarrow 0}{\frac{1}{A}} = K \frac{A}{V} S_{ap} = K^* S_{ap}$$

O método utilizado para se determinar a VDI é conhecido como dissolução intrínseca em disco. A VDI é definida como a taxa de dissolução de uma substância pura obtida em determinadas condições, onde parâmetros como área superficial, temperatura, velocidade de agitação, pH e força iônica do meio de dissolução são mantidos constantes. A massa dissolvida por unidade de tempo, considerando uma área superficial exposta fixa, é expressa em mg/min/cm<sup>2</sup> (USP 35, 2012; PELTONEN et al., 2003).

Para calcular a taxa de dissolução deve-se construir um gráfico com a quantidade acumulada do fármaco dissolvido por unidade de área em função do tempo. A concentração do fármaco dissolvida deve ser corrigida, em cada intervalo de tempo, levando-se em consideração o volume de amostragem. A taxa de dissolução intrínseca da amostra expressa em mg/min/cm<sup>2</sup>, é dada pela inclinação da reta, obtida por regressão linear (USP 35, 2012; YU et al., 2004).

O equipamento utilizado para determinar a velocidade de dissolução intrínseca descrito na USP, e conhecido como *Wood's apparatus*, tem sua origem em estudos realizados por John Wood em 1963 (USP 35, 2012; WOOD, 1965;).

O dispositivo consiste em um punção e uma matriz, fabricadas em aço resistente. Existe uma cavidade na matriz, onde é colocada a amostra que será comprimida em uma prensa hidráulica. Desse modo produz-se um disco compacto (pastilha) utilizando a força de compressão mínima necessária para que o mesmo não desintegre. A amostra terá apenas uma face exposta, cuja área é previamente definida (normalmente 0,5 cm<sup>2</sup>).

Conecta-se ao dissolutor a haste que fixa a matriz contendo a pastilha que ficará imersa no meio de dissolução. Alguns cuidados devem ser observados no momento da análise para não ocorrer alterações no fluxo do meio de dissolução, como: alinhamento da haste, formação de bolhas de ar na superfície da pastilha e ainda ajuste da distância de 3,8 cm entre o fundo da cuba e a área de exposição da pastilha ao meio de dissolução.

Alíquotas do meio de dissolução devem ser retiradas em intervalos de tempo pré-determinados para serem analisadas por métodos de quantificação previamente validados. Em virtude das características de cada fármaco, o tempo total do teste pode variar, porém o mesmo deve ser finalizado quando a 50% a 75% da pastilha estiver dissolvida, sem ter se desprendido da matriz (USP 35, 2012; WOOD, 1965)

#### **4.3.6 Cristalização**

Existem diferentes formas para obtenção de cristais através da promoção da alteração do estado líquido para o estado sólido. Pode-se promover o resfriamento de uma substância após ter sido fundida ou ainda promover alteração no sistema de uma substância em solução até se obter um sólido. A dissolução de um soluto em um líquido ocorre, em determinadas temperatura e pressão, até obter-se uma solução saturada. A partir da qual é possível se obter cristais por diferentes formas: remoção do líquido através de evaporação, resfriamento da solução (tendo em vista a diminuição da solubilidade em temperaturas mais baixas) e ainda através da adição de outro líquido o qual seja miscível com a solução, mas no qual o soluto seja pouco solúvel (AULTON, 2005).

Torna-se muito conveniente, em virtude do fácil manuseio, o uso de solventes para a obtenção de diferentes formas polimórficas. Partindo-se de tentativas experimentais é possível promover a cristalização de uma substância, sendo que para realizar a escolha do solvente adequado é necessário que se considerem alguns fatores, conforme ilustrado na figura 4 (GU, YOUNG, GRANT, 2001).

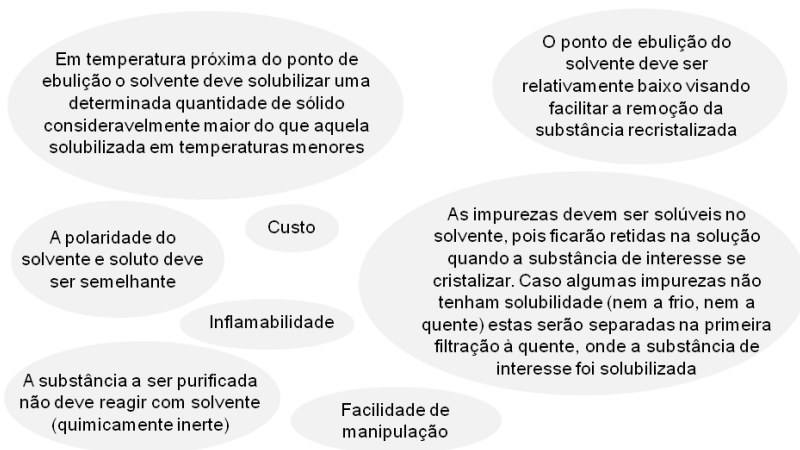


Figura 4 – Esquema ilustrativo dos fatores que interferem no processo de cristalização mediada por solventes.





## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 MATERIAIS**

No presente trabalho, para os estudos de caracterização, os materiais utilizados foram: matéria-prima de fluvastatina (FLV-MP), com grau de pureza de 99,5%, e substância química de referência do fármaco, obtida da Farmacopéia Americana (USP) (FLV-USP), ambas na forma sódica. Solventes de grau analítico foram utilizados, sem purificação adicional, para a obtenção das formas cristalinas.

### **5.2 MÉTODOS**

#### **5.2.1 Preparação de diferentes formas cristalizadas de FLV**

As amostras cristalizadas foram obtidas através do método de cristalização por resfriamento. Primeiramente foram realizados testes com diversos solventes e misturas de solventes tendo como objetivo produzir soluções saturadas contendo matéria-prima de FLV. Uma quantidade pré-determinada de FLV-MP, para atingir a condição de saturação da solução em temperatura ambiente, foi dissolvida em solvente a  $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante, até total solubilização. Após a solubilização as amostras foram resfriadas à  $8^{\circ}\text{C}$  em refrigerador, por um período suficiente até a cristalização. Através da mudança na temperatura das soluções atingiu-se uma condição de supersaturação. Apesar de o procedimento ter sido realizado utilizando-se diversos solventes apenas as amostras produzidas em etanol e acetonitrila apresentaram adequada cristalização. Os cristais obtidos a partir dessas soluções foram armazenados em refrigerador e receberam as respectivas denominações FLV-EOH e FLV-ACN.

#### **5.2.2 Técnicas de Caracterização no estado sólido**

##### **5.2.2.1 Difração de Raios X de pó (DRX)**

Os padrões de difração de raios-X foram obtidos em difratômetro XPERT PANalytical, com CuK, tubo e filtro de Ni,

tensão de 45kW e corrente de 40 mA, na faixa de 60-80 (2 $\theta$ ), 0,016 (step) e 30 segundos, equipado com detector X' Celerator. As fendas divergentes e anti-espalhamento, eram de 0,5° e 0,25°, respectivamente.

#### **5.2.2.2 Análise Térmica: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)**

As curvas DSC foram obtidas utilizando equipamento Shimadzu DSC-60 de célula sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, com fluxo de 50 mL/min. Aproximadamente 2 mg de cada amostra foram pesados e colocados em cadinho de alumínio selado. As análises foram realizadas na faixa de 40 a 300°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min. A célula DSC foi calibrada com Índio (Ponto de Fusão de 156,6°C e Entalpia de fusão de 28,54J/g) e Zinco (Ponto de Fusão de 419,6°C). As medidas de TG/DTG foram realizadas em Termobalança TGA-50 (Shimadzu), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Aproximadamente 6 mg de cada amostra foram pesadas e colocadas em cadinho de platina. As análises foram realizadas na faixa de 40 a 300°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio.

#### **5.2.2.3 Técnicas espectroscópicas**

##### **a) Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)**

Os espectros de infravermelho foram medidos em espectrofotômetro Shimadzu (Prestige), com intervalo de verificação de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup> e média de mais de 32 varreduras. Um espectro de fundo (background) foi obtido para cada condição experimental.

##### **b) Espectroscopia Raman**

PeakSeeker 785 (RAM-PRO-785) da OceanOptics. Comprimento de onda de excitação 785 nm e potência entre 5 e 300mW, com tempos de aquisição de até 30 segundos.

### c) Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $C^{13}$  em solução foram realizados em espectrômetro RMN Varian a 100 MHz. Os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno DMSO- $d_6$ , a 39,52 ppm.

Os espectros de alta resolução de RMN de  $C^{13}$  no estado sólido foram realizados utilizando o método de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico (CP/MAS). Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente em espectrômetro Bruker Avance II equipado com sonda MAS de 4 mm e operando a 300,13 MHz para prótons e 75,46 MHz para carbonos. Utilizou-se Adamantano como padrão externo para os espectros de  $C^{13}$  e para definir as condições de Hartmann-Hahn nos experimentos de polarização cruzada. A velocidade de rotação foi de 10 kHz e o número de acúmulos para cada composto foi de 2048 com a finalidade de se obter um sinal mais adequado em relação ao sinal de ruído. O tempo de ciclos foi de 5 s e o tempo de contato durante a polarização cruzada foi de 2,5 ms. Uma sequência spinal 64 foi utilizada para o desacoplamento durante a análise com campo de prótons  $H_{1H}$  satisfazendo a equação  $\omega_{1H}/2\pi = \gamma_H H_{1H}/2\pi = 78,2$  kHz.

#### 5.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Philips modelo XL30. As amostras foram colocadas em placas metálicas, utilizando fita adesiva dupla face, e receberam recobrimento de ouro à vácuo (350 Å) em um Polaron E 5000. As amostras foram analisadas diretamente por MEV, em aumentos de 250x a 5000x.

#### 5.2.2.5 Dissolução Intrínseca

A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) foi determinada utilizando aparato para dissolução intrínseca da USP 35 através do método do disco estacionário. Uma pastilha de cerca de 13 mm de diâmetro foi obtida por compressão de 100 mg de amostra em pó através de prensa hidráulica, cuja força foi de 400 Kgf, pelo período de 1 min. Estudos de dissolução foram realizados em 900 ml de tampão fosfato pH 6,8

a  $37 \pm 0.5$  °C e velocidade de rotação de 100 rpm. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-definidos, sendo realizada a reposição do meio de dissolução. A quantificação foi realizada através de método por cromatografia líquida, previamente desenvolvido e validado (GOMES, 2009). A VDI foi calculada a partir da inclinação da reta, baseada na liberação do fármaco no meio de dissolução. Para se obter as condições utilizadas na VDI, realizou-se etapa de desenvolvimento do método, onde foram testados diferentes meios de dissolução e diferentes forças de compressão na produção das pastilhas das amostras.

#### a) Preparo das pastilhas

Pesaram-se quantitativamente cerca de 100 mg de matéria-prima de FLV que foram adicionados à cavidade da matriz do dispositivo de Wood's. O Pó foi comprimido em prensa hidráulica a 400 kgf pelo período de um minuto, obtendo-se uma pastilha compacta não desintegrante de  $0.5 \text{ cm}^2$  de área. No dispositivo apenas a superfície inferior da pastilha fica exposta ao meio de dissolução.

#### b) Procedimento

A matriz foi fixada à haste e o conjunto conectado ao aparelho de dissolução. O dispositivo foi imerso no meio de dissolução (900mL de tampão fosfato pH 6.8 à  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , previamente desgaseificado).

A área de exposição da pastilha foi ajustada para 3,8 cm do fundo da cuba de dissolução, conforme descrito na USP 35 (2012), e, imediatamente, iniciou-se a agitação da haste a 100 rpm. Foram coletadas amostras de 5 mL para a quantificação do fármaco dissolvido nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos. Após cada coleta houve reposição com igual volume do meio de dissolução.

### 5.2.2.6 Análise de Teor

As amostras foram quantificadas através de método por cromatografia líquida, previamente desenvolvido e validado (GOMES, 2009). As análises foram realizadas em coluna C<sub>18</sub> Waters Xbridge (12,5 cm x 3,9 mm, 4 µm) à temperatura

ambiente, utilizando cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, detector de comprimento de onda variável SPD-10AV (fixado em 238 nm) e unidade controladora do sistema SCL-10AVP. A fase móvel era constituída de metanol e água (70:30, v:v), com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico, a um fluxo de 1 mL/min (GOMES, 2009).

#### **5.2.2.7 Determinação de água por Karl-Fischer (KF)**

O teor de água nas amostras foi avaliado através do método de Karl-Fischer, utilizando titulador Mettler DL 38 (Suíça). Utilizou-se água ultra-pura (mili-Q) para padronização do reagente de KF e metanol grau espectroscópico para titulação das amostras. O teor de água de todas as amostras foi expresso em porcentagem (m/m %).



## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS EM CONDIÇÕES AMBIENTE

A caracterização física no estado sólido de fármacos tem se tornado uma área de grande interesse na farmácia, e tem sido objeto de muitos estudos nos últimos anos (BRITTAIN, 2011; CHIENG, RADES, AALTONEM, 2011; BRUSAU et al., 2008; CUFFINI et al., 2007; MARTINO et al., 2007; PALACIO et al., 2007; GAMBERINI et al., 2006; AGRAWAL et al., 2004; HUANG, TONG, 2004). No entanto, para alguns fármacos, como é o caso da FLV, estudos de uma caracterização completa do estado sólido e diferentes polimorfos não tem sido relatados. Encontram-se na literatura trabalhos que relatam melhorias na estabilidade química e física, em aplicações da FLV com polímeros (PAPAGEORGIOU et al., 2009) e preparação de sistemas intercalados (PANDA, DRIVASTANA, BAHADUR, 2009). Entretanto, pode-se observar que os padrões de DRX para o fármaco puro, que foram relatados nesses trabalhos, apresentam formas cristalinas diferentes. Portanto, esses resultados são válidos com esse polimorfo e poderiam ser diferentes dependendo da forma cristalina da FLV utilizada. Destaca-se, também, que várias patentes referentes à obtenção de formas cristalinas da FLV encontram-se depositadas, porém a caracterização destas formas apresentada nos registros é bastante incompleta (LIFSHITZ-LIRON et al., 2008; VAN DER SCHAAF, BLATTER, SZELAGIEWICZ, 2008; CHAVHAN, et al., 2008; HUANG, 2007; RAO et al., 2007; VAN DER SCHAAF, BLATTER, SZELAGIEWICZ, 2006; VAN DER SCHAAF et al., 2005; SURI, SARIN, 2004; HORWATH, 2000). É importante salientar que este fármaco não possui, até o presente momento, a sua estrutura cristalina resolvida.

No Brasil a FLV é comercializada por apenas duas empresas nas formas de comprimidos e cápsulas. Encontra-se monografia na farmacopeia americana tanto para a matéria-prima, como para as formas farmacêuticas de comprimidos e cápsulas. Para realização do trabalho proposto, a matéria-prima de FLV-MP foi adquirida por importação de fornecedores da China e a substância química de referência (FLV-USP) foi adquirida da Farmacopéia Americana. A matéria-prima

apresentava-se como pó fino e branco enquanto que FLV-USP possuía aspecto cristalino de coloração amarela.

FLV é um fármaco de Classe I (BUDAVARI, 2006; MOFFAT et al., 2004; KASIM et al., 2003; YU et al., 2002) com tendência higroscópica. A USP em sua monografia para FLV indica a realização da determinação do conteúdo de água antes do início do uso da substância em experimentos. A monografia da USP para FLV estabelece que o conteúdo de água não seja superior a 4%.

FLV-MP foi adquirida contendo 4,1% de água, conforme laudo emitido pelo fornecedor, no entanto experimentalmente encontrou-se um teor de 3,93% de água. Enquanto que, FLV-USP, conforme preconizado pela USP, o conteúdo de água foi determinado antes de sua utilização nos experimentos, obtendo-se como resultado teor de 9,2%. É válido salientar que nos laudos de FLV-MP e FLV-USP não é mencionado que FLV possa estar na forma de hidrato.

Com a finalidade de caracterizar as propriedades do estado sólido e a presença de polimorfismo na FLV, realizou-se uma caracterização completa utilizando diferentes técnicas para as seguintes amostras: FLV-MP, FLV-USP, FLV-EOH e FLV-ACN.

Os resultados da difração de raios-X em pó das amostras estão apresentados na figura 5.



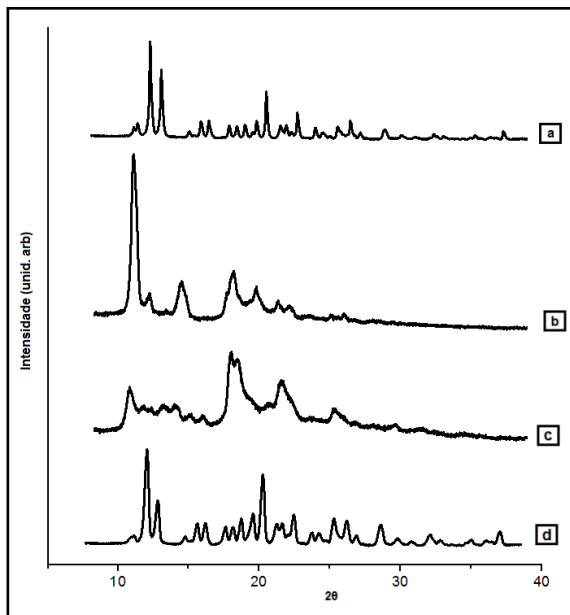


Figura 5 - Difratomogramas de Raios X das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-MP; c) FLV-USP; d) FLV-EOH

A amostra de FLV-ACN apresentou um padrão de reflexões bem definidas, evidenciando que a amostra é cristalina. A FLV-MP mostrou as mesmas posições das reflexões do padrão de DRX, com leves diferenças nas intensidades. Isto poderia ser atribuído ao efeito de orientação preferencial o que explicaria a diferença das intensidades nos padrões. Portanto, estes resultados sugerem que a FLV-ACN e a FLV-MP correspondem à mesma forma cristalina ou polimorfo.

Já o padrão de difração da substância de referência da Farmacopeia Americana (FLV-USP) apresentou uma estrutura com maior desordem na rede, quando comparada com as formas cristalinas anteriores, evidenciada pelo alargamento observado nas reflexões. Embora esse alargamento dificulte uma correta identificação da fase, percebe-se que corresponde a uma estrutura cristalina diferente da analisada anteriormente. Portanto, poder-se-ia afirmar que FLV-USP corresponde à outra forma cristalina ou polimorfo diferente do primeiro.

A amostra cristalizada em etanol, FLV-EOH, apresentou muitas reflexões com um alargamento significativo e com alta superposição, que dificulta uma correta identificação. Neste material fica evidente uma baixa cristalinidade e um alto grau de desordem. Devido a essas características não fica claro, a partir da análise do padrão de DRX, se a FLV-EOH corresponderia à outra forma polimórfica pura, diferente das anteriores (FLV-MP/FLV-ACN e FLV-USP), ou a uma mistura de formas cristalinas (também chamadas fases cristalinas).

No entanto, através dos resultados de DRX em pó, pode-se sugerir que FLV estaria apresentando dois polimorfos puros (FLV-ACN e FLV-USP) e, provavelmente com a cristalização em etanol (FLV-EOH), uma mistura de fases. Embora se tenham alguns resultados que seriam conclusivos, levando-se em consideração a similaridade existente entre FLV-ACN e FLV-MP e ainda a diferença destes com relação à FLV-USP, os resultados obtidos com FLV-EOH ainda são inconclusivos, tornando muito importante a complementação da caracterização do estado sólido das diferentes formas cristalinas com o auxílio de outras técnicas.

Para caracterizar a morfologia das amostras utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura, e as fotomicrografias por esta técnica estão apresentadas na Figura 6. As partículas de FLV-ACN apresentaram hábito acicular com geometria bem definida o que seria um bom indicador de uma boa cristalinidade nessa amostra. A morfologia de FLV-MP apresentou aspecto diferente da apresentada por FLV-ACN em relação ao hábito e com uma geometria das partículas não bem definida (ver figura 6). O tamanho das partículas, em forma qualitativa observado por MEV, foi menor que o mostrado na FLV-ACN. As amostras de FLV-EOH e FLV-USP apresentaram tamanhos de partículas maiores, com formas irregulares, evidenciando maior grau de desordem. Principalmente, a amostra FLV-EOH apresentou um aspecto típico de amostras com alto grau de desordem.

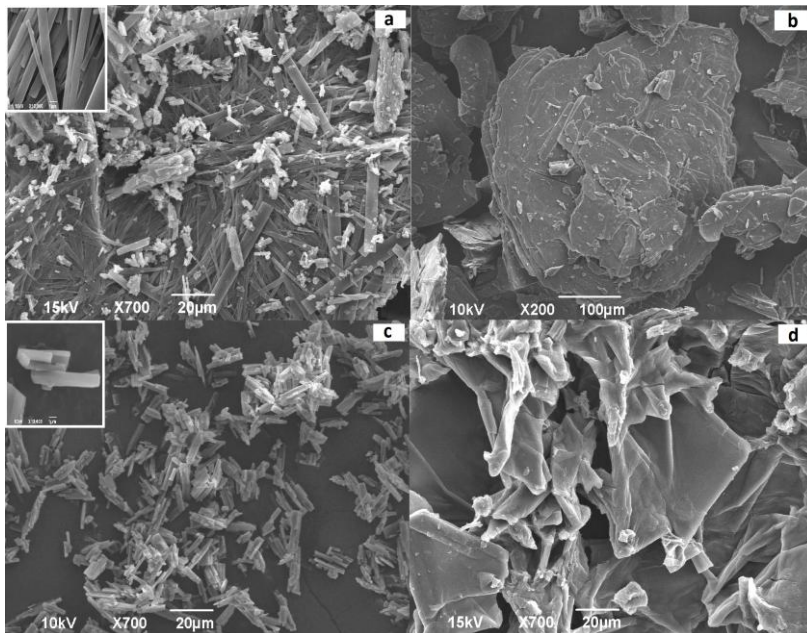


Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura das diferentes formas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-MP; d) FLV-EOH.

A caracterização das propriedades térmicas fornece resultados muito importantes para estudar as diferentes formas sólidas, como: modificações dependentes das condições ambientais, perdas de água e forma de ligação da água com o sólido (CLAS, DALTON, HANCOCK, 1999).

As curvas de DSC das diferentes amostras de FLV estão apresentadas na figura 7. As amostras apresentam dois eventos endotérmicos, porém apenas o evento próximo a 145°C foi coincidente nas quatro amostras. As amostras, FLV-ACN e FLV-MP, apresentaram curvas coincidentes, principalmente nas temperaturas das endotermas com diferenças nas entalpias (Tabela 1). Já a amostra FLV-USP apresentou uma endoterma anterior, em torno de 107,21°C, e a outra a 149,34°C. Na curva de FLV-EOH o primeiro evento endotérmico apareceu em 120,20°C e o segundo evento em 149,34. Estes dados estão mostrando diferenças (FLV-MP e FLV-USP) e similaridades (FLV-MP e FLV-ACN) que estão em acordo com os resultados

obtidos por DRX. Entretanto, para ter um conhecimento mais aprofundado do comportamento destes materiais foi necessário estudar as perdas de massa em comparação com os processos endotérmicos observados, por isso realizaram-se estudos por TG. No entanto, torna-se importante, ter o conhecimento prévio do conteúdo total de água nas diferentes amostras, para ter como referência.

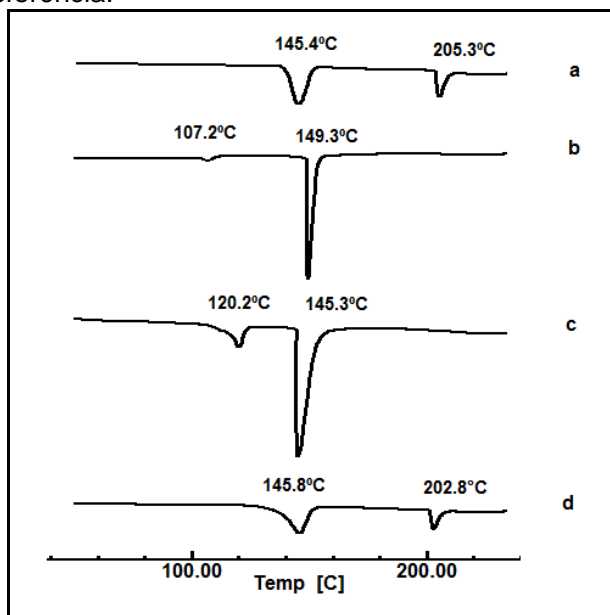


Figura 7 - Curvas de DSC das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP

Tabela 1 - Resultados obtidos com as curvas de DSC das diferentes formas cristalinas de FLV

Amostra	1° Endoterma		2° Endoterma	
	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (J/g)	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (J/g)
FLV-ACN	145,40	-106,34	205,27	-137,29
FLV-EOH	120,20	-46,40	145,31	-245,69
FLV-USP	107,21	-14,03	149,34	-142,19
FLV-MP	145,82	-111,04	202,81	-26,69

Era para rever os valores da tabela

Como em todo fármaco e suas diferentes formas sólidas é relevante ter um controle do conteúdo total da água, que neste caso, foi realizado pelo método de Karl Fischer. Esse controle torna-se relevante, principalmente, em locais onde se encontra uma elevada umidade ambiental, como é o caso de Florianópolis, onde se encontra um índice entre 60 % e 80 % dependendo da época do ano (BOTT, OLIVEIRA, 2007). Mesmo que se mantenham cuidados adequados, no caso de o fármaco possuir grande tendência à incorporação de água, torna-se importante a realização de um rigoroso acompanhamento e entendimento de como as condições ambientais podem impactar sobre o fármaco. O conteúdo de água das amostras está apresentado na tabela 2, onde se observam os altos valores em porcentagem de água que apresentaram as amostras estudadas.

Essas moléculas de água presentes no sólido poderiam estar fraca ou fortemente ligadas e/ou formando parte da estrutura molecular. Neste último caso, a FLV estaria na forma de hidrato. Os estudos de DSC complementados com TG poderiam agregar informações relevantes a respeito de a FLV estar na forma de um hidrato.

Devido às diferenças encontradas a partir da avaliação de FLV-MP e FLV-USP optou-se, inicialmente, pela investigação de diferentes polimorfos em FLV-MP, partindo-se da recristalização da matéria-prima em diferentes solventes. Tal fato justifica a diferença nas datas de realização das análises de determinação do conteúdo de água por Karl-Fischer, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 - Determinação do conteúdo de água por Karl-Fischer

Amostra	Teor de água (%)	Data Análise	Data Produção Lote
FLV-ACN	4,95%	05/2011	10/2010
FLV-USP	9,21%	12/2010	07/2008
FLV-EOH	16,17%	05/2011	10/2010
FLV-MP	3,93%	12/2010	10/2008

Nas análises realizadas por TG foram observadas perdas de massa, como pode ser visualizado na Figura 8. Nas Curvas DTG ampliadas, apresentadas na Figura 9, evidencia-se que os eventos de perda de massa aconteceram abaixo de 140°C e acima de 220°C. Portanto, as endotermas das amostras entre

140°C e 210°C, detalhadas na tabela 1, correspondem a eventos de fusão sem perda de massa. Podendo-se concluir que as duas endotermas da FLV-ACN e FLV-MP seriam fusões sem perda de água, sendo que a maior quantidade de perda de água corresponderia entre 109,2°C e 126,5°C. Essas temperaturas seriam significativamente elevadas para poder-se afirmar que estaria ocorrendo uma perda de água adsorvida ou fracamente ligada. Portanto, esses resultados estariam evidenciando que a água presente na estrutura cristalina estaria fortemente ligada.

As amostras de FLV-USP e FLV-EOH também apresentaram um altíssimo conteúdo de água, mais de 9% e 16%, respectivamente. A perda de massa majoritária ocorreu em altas temperaturas, como pode ser observado na tabela 3. Pode-se comprovar, realizando a comparação entre a perda de massa por TG e a determinação de água por Karl Fisher, que nestes dois últimos eventos parte da perda de água aconteceria junto com a degradação em temperaturas elevadas (superiores a 240°C). Portanto, fica claro que se trataria de hidratos. No caso da FLV-EOH, poderia estar ocorrendo a incorporação do solvente, etanol, na estrutura do sólido, porém estes resultados não seriam suficientes para determiná-lo.

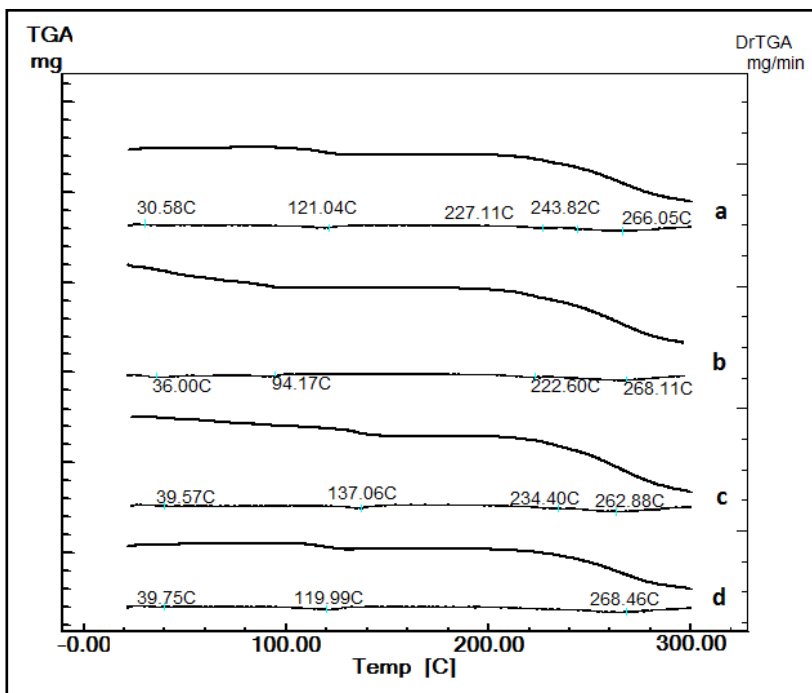


Figura 8 - Curvas TG e DTG das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP

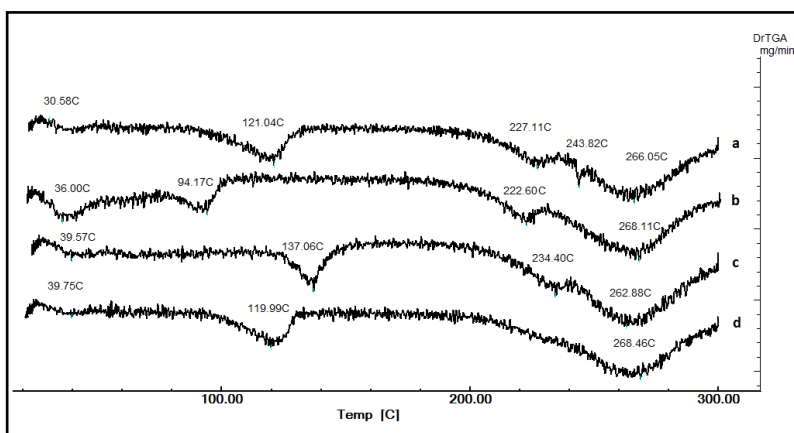


Figura 9 - Curvas DTG ampliadas das diferentes formas cristalinas de FLV a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP

Tabela 3 - Resultados obtidos com as curvas TG e determinação de água por KF das diferentes formas cristalinas de FLV.

Amostra	FLV-USP		FLV-EOH		FLV-MP	
	Faixa (°C)	%	Faixa (°C)	%	Faixa (°C)	%
	33,7-44,8	1,7	35,4-46,7	2,6	31,9-44,9	0,4
	60,3-70,4	1,7	118,6-150,4	2,7	109,2-126,5	3,6
	95,6-104,2	0,4	-	-	-	-
	207,7-224,1	3,1	-	-	-	-
	246,7-279,4	15,3	243,8-289,6	22,8	240,6-281,9	21,3
KF	9,21%		16,17%		3,93%	

Para confirmar algumas das evidências encontradas e poder definir se FLV-EOH apresenta solvente incorporado em sua estrutura foi importante realizar estudos das amostras através das diferentes técnicas espectroscópicas. As técnicas utilizadas foram: RMN, FT-IR e Raman.

O estudo por espectroscopia de RMN foi realizado tanto em solução (DMSO) como no estado sólido. Desta forma é possível obter-se uma informação completa da estrutura molecular e cristalina da FLV e também evidências estruturais como número de moléculas presentes na unidade assimétrica e a presença ou não de solvente incorporado na estrutura cristalina. O espectro de RMN da FLV em DMSO apresentou os seguintes deslocamentos químicos detalhados na tabela 4 (a numeração dos carbonos está indicada na Figura 3). Os valores dos deslocamentos encontrados experimentalmente estão de acordo com os deslocamentos encontrados na literatura (CERMOLA et al., 2007), porém podem ser observadas algumas diferenças que são relacionadas ao uso de diferentes solventes (HARRIS, 2006).



Avaliaram-se as amostras de FLV-MP e FLV-EOH obtendo-se espectros  $^{13}\text{C}$  CP-MAS, como pode ser observado na figura 10. Justifica-se a ausência da análise de FLV-ACN visto que as análises de DRX realizadas indicaram que FLV-ACN e FLV-MP possuem a mesma forma cristalina. Entretanto, a ausência da avaliação de FLV-USP por  $^{13}\text{C}$  CP-MAS, é justificada em virtude da quantidade insuficiente de amostra.

Os espectros dos carbonos quaternários (NQS) de FLV-MP e FLV-EOH estão ilustrados na figura 11. Os carbonos do espectro da FLV-MP (ver tabela 4) foram atribuídos levando-se em consideração as informações dos carbonos quaternários (NQS), do acoplamento escalar spin-spin de  $^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$ , do acoplamento dipolar residual de  $^{13}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$  e ainda utilizando como referência as atribuições realizadas por Cermola (2007) após análise de FLV por RMN em Clorofórmio.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  de FLV indica que existe apenas uma molécula por unidade assimétrica da cela unitária da estrutura cristalina. Também, observa-se a divisão no sinal do C4', 158,1 e 162,5 ppm, devido ao acoplamento escalar spin-spin ao núcleo  $^{19}\text{F}$ . A constante de acoplamento escalar spin-spin entre  $^{13}\text{C}$  e  $^{19}\text{F}$  é de  $(267 \pm 5)$  Hz e está de acordo com aquele valor obtido do espectro em solução  $(242.8 \pm 0.4)$  Hz, que por sua vez resulta um valor aproximado a aquele reportado para esteroides (CARSS, 1995). A ressonância do C16 mostra um alargamento característico do acoplamento quadrupolar ao núcleo de  $^{14}\text{N}$ . Isto é claramente observado para os C15 e C10 no espectro de carbonos quaternários (NQS).

O espectro de FLV-EOH apresenta muitas ressonâncias coincidentes com o espectro da FLV-MP. Entretanto algumas diferenças foram identificadas (com \* no gráfico) comparando os dois espectros. A ressonância dos carbonos das metilas, que aparecem como um único sinal no caso da FLV-MP, é evidenciada em FLV-EOH por dois sinais, cuja relação de intensidades é de 2:1. Este resultado sugere a presença de pelo menos duas moléculas na unidade assimétrica ou a presença de grupos  $\text{CH}_3$  do solvente. Em relação ao espectro  $^{13}\text{C}$  de FLV-MP, observa-se na região 100-150 ppm do espectro  $^{13}\text{C}$  de FLV-EOH a presença de dois sinais de ressonância adicionais em 139,0 e 120,8 ppm. Na região 40-80 ppm do espectro  $^{13}\text{C}$  da FLV-EOH são observados quatro sinais de ressonância adicionais, 45,3; 68,5; 70,9 e 72,3 ppm. Finalmente, o sinal a 45,3 e 68,5 não

foram suprimidas pela sequencia de pulsos NQS da FLV-EOH (ver Figura 11); sendo espectros de NQS similares, exceto pela presença dessas ressonâncias adicionais (45,3 e 68,5 ppm). Esses deslocamentos poderiam ser atribuídos aos sinais de ressonância do grupo  $\text{CH}_3$  da molécula do solvente (etanol) em diferentes locais do sólido ou estrutura cristalina (PARK et al., 2005). Com essa atribuição, poderia se confirmar que FLV-EOH apresenta moléculas de etanol como parte de sua estrutura cristalina, devendo então ser identificado como um solvato. Comparando os espectros de RMN de FLV em solução e no estado sólido poder-se-ia afirmar que a conformação da molécula em sólido e em solução não apresenta diferenças significativas.

Tabela 4 - Dados espectrais de  $^{13}\text{C}$  RMN FLV em DMSO, dados reportados em  $\text{CD}_3\text{OD}$  comparativos com  $^{13}\text{C}$  CP/MAS RMN sólido.

Nº Carbono	$^{13}\text{C}$ RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$^{13}\text{C}$ RMN (DMSO)	SOLIDO
1	180,2	176,9	181,3
2	45,3*	45,07*	42,5
3	68,8	66,26	65,2
4	45,6*	44,03*	44,0*
5	72,2	69,25	70,3
6	141,4	142,20	136,9
7	123,1	117,13	118,4
8	130,2	134,68	133,0
9	113,3	113,24	114,8
10	130,2	127,99	127,6
11	120,6	119,02	121,4
12	120,6	119,02	121,4
13	121,0	119,93	121,4
14	113,3	121,88	122,0
15	138,0	135,08	135,8
16	48,9	47,54	48,0
17	22,4	21,76	19,9
18	22,4	21,76	19,9
1'	134,6	131,95	131,3
2'	133,7	132,11	131,9
3'	116,7	115,70	112,7
4'	163,5	161,02	160,8
5'	116,7	115,70	112,7
6'	133,7	132,11	131,9

\*podem estar trocados

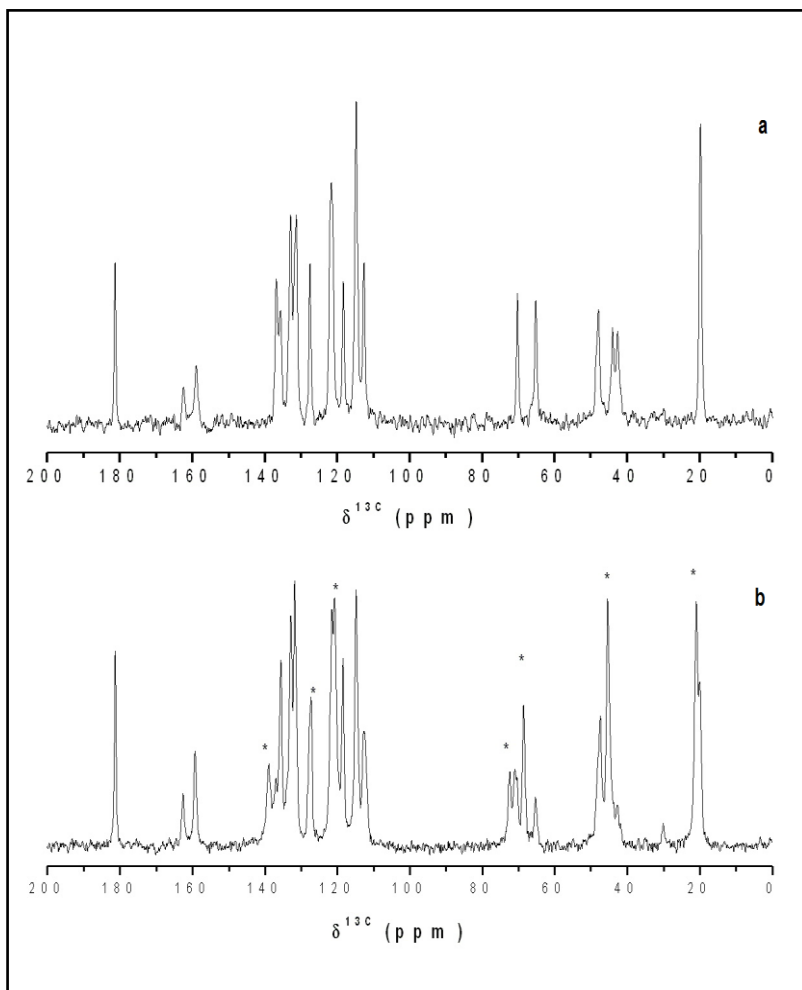


Figura 10 - Espectros  $^{13}\text{C}$  CP/MAS RMN sólido de FLV-MP (a) e FLV-EOH (b) (\* deslocamentos químicos diferentes dos deslocamentos encontrados em FLV-MP)

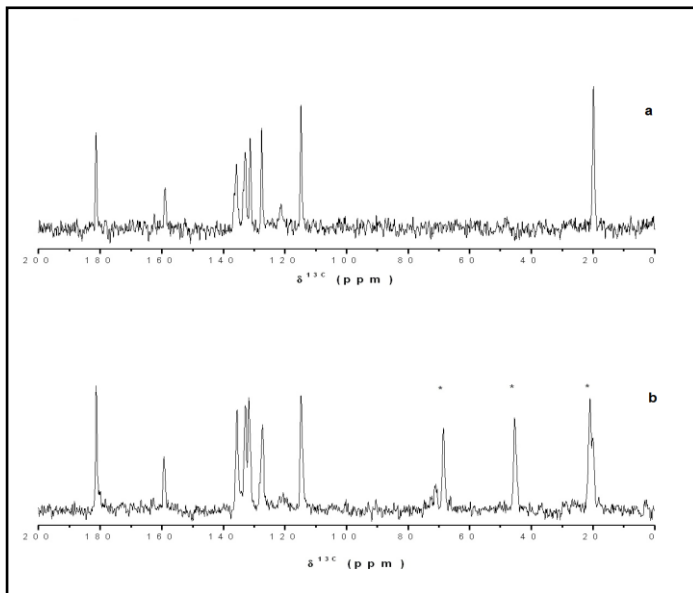


Figura 11 - Espectros  $^{13}\text{C}$  CP/MAS RMN sólido NQS de FLV-MP (a) e FLV-EOH (b) (\* deslocamentos químicos diferentes dos deslocamentos encontrados em FLV-MP)

Os espectros de FT-IR das amostras estão apresentados na Figura 12. A interpretação dos espectros de infravermelho baseia-se na presença dos grupos funcionais mais importantes. As sutis diferenças encontradas entre os espectros das formas cristalinas de FLV podem indicar modificações estruturais e fornecer informações sobre interações intermoleculares das amostras. As principais diferenças foram encontradas na região entre  $1557$  e  $1587\text{ cm}^{-1}$ , região esta indicativa do sal como carboxilato. Observe-se que para as duas amostras que foram identificadas por DRX e DSC como a mesma forma cristalina, FLV-ACN e FLV-MP, apresentam um valor de frequência de  $1587\text{ cm}^{-1}$  e  $1585\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, a amostra FLV-USP apresentou um valor de  $1568\text{ cm}^{-1}$ . Encontram-se descritos na literatura valores diferentes para o mesmo grupo carboxilato de FLV sódica em  $1576\text{ cm}^{-1}$  (PAPAGEORGIOU et al., 2009) e  $1573\text{ cm}^{-1}$  (PANDA, DRIVASTANA, BAHADUR, 2009). É importante salientar os padrões de DRX apresentados

por Papageorgiou (2009) e Panda e colaboradores (2009) também apresentaram diferenças com relação aos padrões encontrados experimentalmente no presente trabalho. Portanto, a diferença encontrada nas bandas do espectro de IR poderia ser explicada pelo fato de serem formas cristalinas diferentes.

As bandas encontradas na região entre 3300 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  presente em todas as amostras representam os estiramentos do grupo funcional hidroxila (OH) correspondente, principalmente, à presença de água. Na região entre 1500 e 800  $\text{cm}^{-1}$  pode-se observar nos espectros de forma qualitativa as semelhanças encontradas entre FLV-MP e FLV-ACN e as diferenças destes com relação à FLV-USP e FLV-EOH. O grupamento amina presente na estrutura de FLV pode ser identificado pela banda encontrada na região de 1215  $\text{cm}^{-1}$ , já o halogênio Flúor presente na molécula pode ser identificado pela banda apresentada ao redor de 1048  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros Raman coletados para FLV-MP e FLV-EOH estão apresentados na figura 13. O espectro Raman de FLV-MP apresenta predomínio de um conjunto de sinais bem definidos. Infelizmente o espectro encontrado na literatura (PANDA, DRIVASTANA, BAHADUR, 2009.) não está claramente definido para uma correta comparação com os dados da figura 13. Foram observadas tanto diferenças como similaridades/semelhanças em relação aos dados da literatura, entretanto a comparação desses dados realiza-se apenas a nível qualitativo e com determinadas limitações. A amostra de FLV-EOH apresenta a mesma sequência de sinais que FLV-MP, porém nesta amostra observa-se um halo, evidenciando uma desordem na rede cristalina.

Portanto, os resultados obtidos pelas espectroscopias FT-IR, Raman e CP/MAS  $^{13}\text{C}$  RMN estariam evidenciando que uma das formas cristalinas que apresenta o FLV-EOH poderia ser a mesma que FLV-MP ou FLV-ACN. Entretanto, sendo uma mistura estaria presente outra forma ou fase muito mais desordenada com evidências de solvente (etanol) na rede.

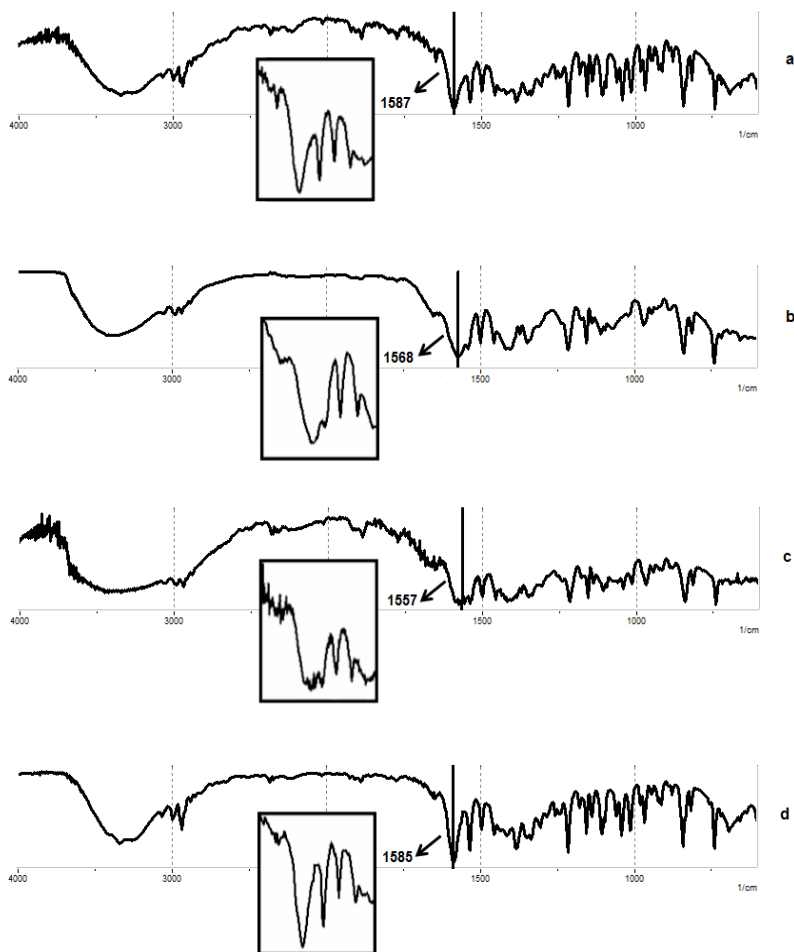


Figura 12 - Espectros de FT-IR obtidos das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-ACN; b) FLV-USP; c) FLV-EOH; d) FLV-MP

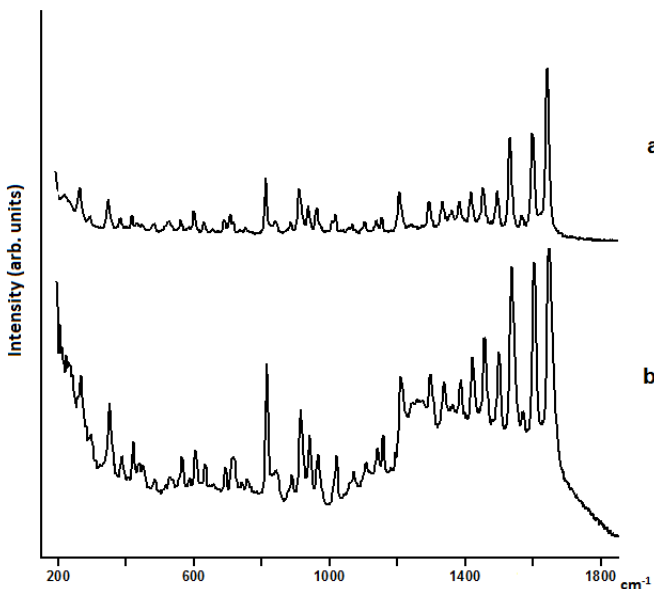


Figura 13 - Espectros Raman obtidos para as amostras a) FLV-ACN e b) FLV EOH (1800-200  $\text{cm}^{-1}$ )

Conforme mencionado anteriormente, a caracterização e o conhecimento do estado sólido de polimorfos e solvatos de um determinado fármaco fornece informações relevantes tanto para o controle de qualidade como para as inovações ou desenvolvimento do produto. Dessa forma, uma propriedade importante a ser determinada, que correlaciona as propriedades anteriormente estudadas com seu impacto a nível biofarmacêutico, é a velocidade de dissolução intrínseca. Esta propriedade permite evidenciar a relevância que parâmetros do estado sólido podem ter sobre o desempenho do fármaco. Esses parâmetros são: estrutura cristalina ou formas polimórficas, morfologia ou hábito cristalino, mistura de fases e grau de ordem / desordem dos materiais, entre outros. Conhecendo o comportamento da velocidade de dissolução das amostras já caracterizadas é possível determinar quais propriedades do estado sólido são mais significativas e deverão ser controladas ou melhoradas para um melhor desempenho do fármaco.

Em virtude de não existirem métodos descritos na literatura para avaliação da dissolução intrínseca de FLV houve a

necessidade de realizar-se a otimização das condições experimentais, a partir das condições de dissolução descritas na monografia do fármaco, para a forma farmacêutica cápsulas (USP 35, 2012). As condições preconizadas nesta monografia são: água (900 ml) como meio de dissolução e rotação de 100 rpm. Para quantificação, utilizou-se método por cromatografia, previamente desenvolvido e validado (GOMES, 2009).

No presente trabalho foram realizados testes com três diferentes meios de dissolução com diferentes pH no intuito de simular as condições de pH fisiológico. Os meios utilizados foram: HCl 0,1 N, tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão fosfato de potássio pH 6,8. Através do método de quantificação indicativo de estabilidade por CLAE utilizado verificou-se que em HCl 0,1N e em tampão acetato de sódio pH 4,5 houve degradação do fármaco. Em tampão acetato pH 4,5 houve degradação a partir dos primeiros minutos, sendo evidenciada pela formação de produtos de degradação que foram detectados juntamente com a quantificação residual do fármaco. Entretanto, em HCl 0,1N a degradação foi de 100% já nos primeiros minutos do teste, não sendo detectado o sinal cromatográfico de FLV.

Embora a água seja o meio indicado na monografia da USP para avaliar a dissolução de FLV, e observando-se que FLV é altamente solúvel em água, optou-se por utilizar meio de dissolução onde FLV apresenta solubilidade um pouco menor que em água, para evitar que ocorresse dissolução total da pastilha durante o ensaio.

Para avaliar a velocidade de dissolução intrínseca de um fármaco é importante que a pastilha produzida não se desintegre durante o ensaio. No desenvolvimento do método para avaliar a VDI foram produzidas pastilhas submetidas a duas condições diferentes de pressão 210 kgf (3000 psi) e 400 kgf (5689 psi). O gráfico representativo da porcentagem de dissolução do fármaco em função do tempo para as diferentes pastilhas obtidas está apresentado na Figura 14, e a equação da reta, juntamente com o valor de  $r$  de cada ensaio, estão apresentados na tabela 5. A pastilha produzida com força de compressão de 210 kgf não cumpriu com o requisito de linearidade não sendo adequada para a produção da pastilha para avaliação da VDI de FLV. A força de compressão de 400 kgf foi escolhida para a produção das pastilhas para a realização dos ensaios de VDI em virtude de ter apresentado adequada linearidade e as concentrações



quantificadas encontrarem-se dentro dos limites de quantificação do método analítico.

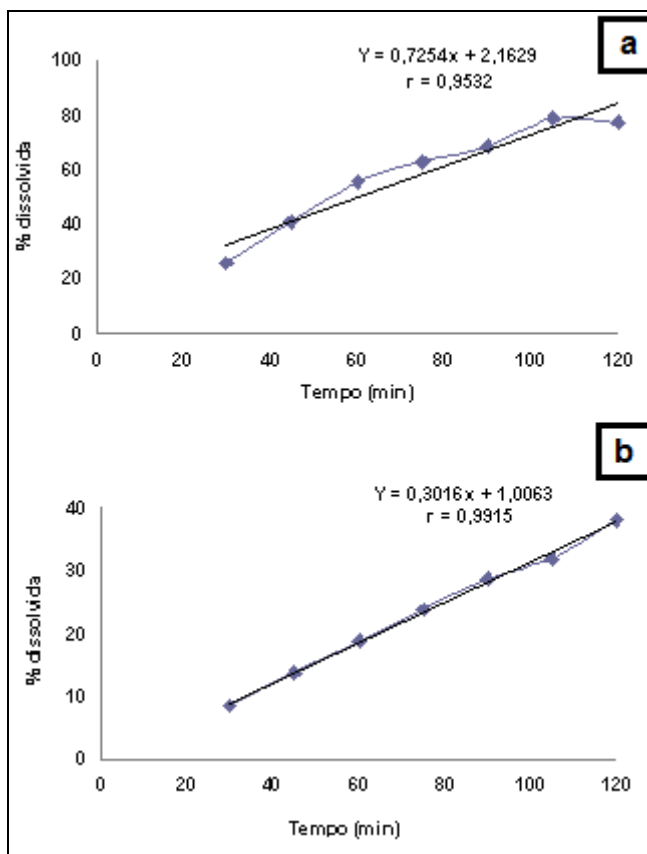


Figura 14 - Gráfico da VDI das pastilhas produzidas utilizando diferentes pressões: a) 210 kgf e b) 400 kgf

Tabela 5 - Equação da reta e r obtidos com a representação gráfica dos resultados dos ensaios de dissolução intrínseca das pastilhas de FLV de 210 e 400 kgf.

Amostra	Equação da reta	r
FLV-210	$Y = 0,7254x + 2,1629$	0,9532
FLV-400	$Y = 0,3016x + 1,0063$	0,9915

Após as condições do método para a avaliação da dissolução intrínseca do fármaco terem sido otimizadas as condições que asseguram linearidade (400 Kgf, tampão fosfato de potássio pH 6,8 e 100 rpm), foram utilizadas para os ensaios dos estudos da VDI das formas cristalinas de FLV, FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH. Em virtude da quantidade limitada de FLV-USP, não foram realizados ensaios com esta forma.

A Figura 15 representa, graficamente, a quantidade de fármaco dissolvido, de cada forma cristalina, em função do tempo mostrando linearidade que permite o cálculo da VDI para cada uma das amostras. Durante o ensaio, para cada intervalo de tempo deve-se realizar a correção, de acordo com a quantidade de fármaco dissolvida, considerando-se os volumes retirados para a leitura das amostras. Para calcular a VDI plota-se gráfico considerando a quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo, e assim através da regressão linear dos pontos, ao obter-se a equação da reta, tem-se como resultado a velocidade de dissolução em unidade de massa por minuto, representada pelo coeficiente angular. Logo, determina-se a VDI dividindo-se o valor do coeficiente angular pela área superficial da pastilha, em  $\text{cm}^2$ .

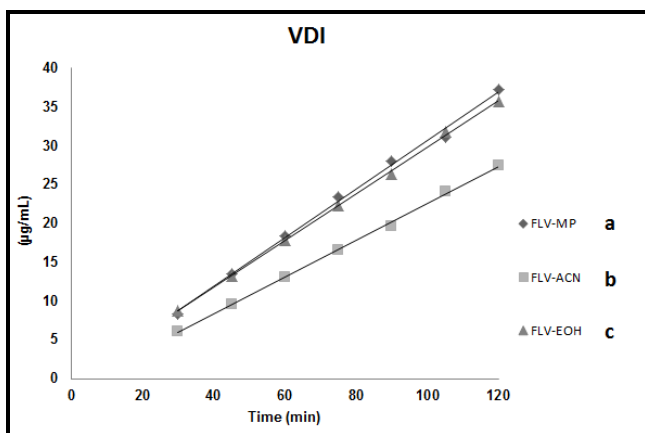


Figura 15 - Representação gráfica da VDI das diferentes formas cristalinas de FLV. a) FLV-MP; b) FLV-ACN; c) FLV-EOH

Tabela 6 - Equação da reta e r obtidos com a representação gráfica dos resultados dos ensaios de dissolução intrínseca das pastilhas de FLV e valores calculados da VDI

Amostra	Equação da reta	r	VDI (mg/min/cm <sup>2</sup> )
FLV-MP	$Y = 0,3132x - 0,6294$	0,9969	0,166
FLV-ACN	$Y = 0,238x - 1,1832$	0,9988	0,095
FLV-EOH	$Y = 0,3023x - 0,3641$	0,9993	0,163

Nos ensaios de VDI em todas as amostras comprovou-se linearidade e os valores da VDI são detalhados na tabela 6. Observa-se uma diferença entre os valores da VDI para FLV-MP e FLV-EOH em relação à FLV-ACN, embora esta última apresente a mesma forma cristalina que FLV-MP. Isto evidencia que no caso da FLV, a VDI modifica-se não só pela estrutura cristalina, mas também por outras características do sólido como poderia ser o hábito cristalino.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DO TEMPO E A TEMPERATURA

No decorrer do estudo percebeu-se que os resultados de algumas análises modificavam-se com o tempo, e então se realizaram estudos com o objetivo de verificar as modificações apresentadas através do tempo. O efeito da temperatura nas amostras também foi avaliado principalmente com o intuito de obter-se conhecimento sobre as transições de fase e estabilidade das diferentes formas cristalinas da FLV identificadas.

Em relação ao comportamento em condições ambientais com o tempo, os resultados do DRX, apresentados na figura 16, mostram que a amostra FLV-MP não apresentou mudança estrutural após o período de um ano. Entretanto, nas amostras FLV-USP e FLV-EOH foram observadas mudanças. Principalmente na amostra de FLV-USP com desaparecimento de algumas reflexões e surgimento de outras. No caso da FLV-EOH (ver figura 16c) pelo fato de ter linhas tão largas com alta superposição, as modificações não são conclusivas por DRX, mas evidenciam uma possibilidade que isto esteja acontecendo possuindo, dessa forma, necessidade de ser confirmado por avaliação com outras técnicas.

Para a amostra de FLV-USP foram realizadas medições no difratômetro a cada 15 min. Verificou-se que houve uma transição com o tempo muito rápida, até os 45 minutos. Essa amostra foi medida novamente após o período de um ano, apresentando modificações (Figura 16b). A pureza destas amostras foi verificada por cromatografia líquida, e verificou-se que as mesmas não apresentavam degradação. O efeito da radiação de DRX e de luz foi analisado e não houve evidências de degradação química durante o ensaio. Portanto, um possível efeito que poderia ter provocado essa transformação tão rápida detectada por DRX na FLV-USP poderia ser a influência da umidade sobre a amostra. A exposição do padrão USP durante as medições de DRX às condições ambientais poderiam ter provocado uma hidratação muito rápida durante a medida, já que o fármaco possui tendência a incorporar água.

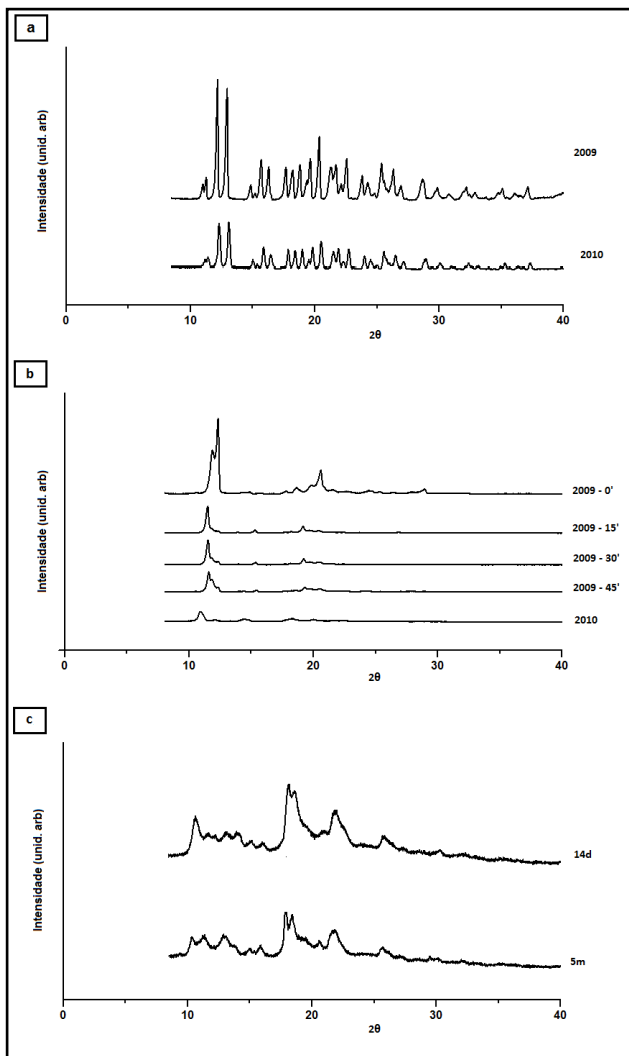


Figura 16 - Padrões de Raios-X das diferentes formas cristalinas de FLV em diferentes tempos de coleta. a) FLV-MP; b) FLV-USP; c) FLV-EOH

Estas amostras também foram estudadas por DSC, e os resultados estão apresentados na figura 17. No intervalo de tempo de um ano não se verificaram diferenças significativas para a amostra de FLV-MP. O DSC da amostra de FLV-USP,

após o período de um ano, apresentou mudanças nas temperaturas, entalpias e aparecimento de outro evento aproximadamente em 144°C (figura 17). Já na amostra FLV-EOH, em apenas 22 dias, foi possível observar o aparecimento deste mesmo evento. Na tabela 7 encontram-se os valores das entalpias resultantes da análise. Isto corrobora as mudanças observadas por DRX, mas também não seriam dados suficientes para definir qual é a origem delas.

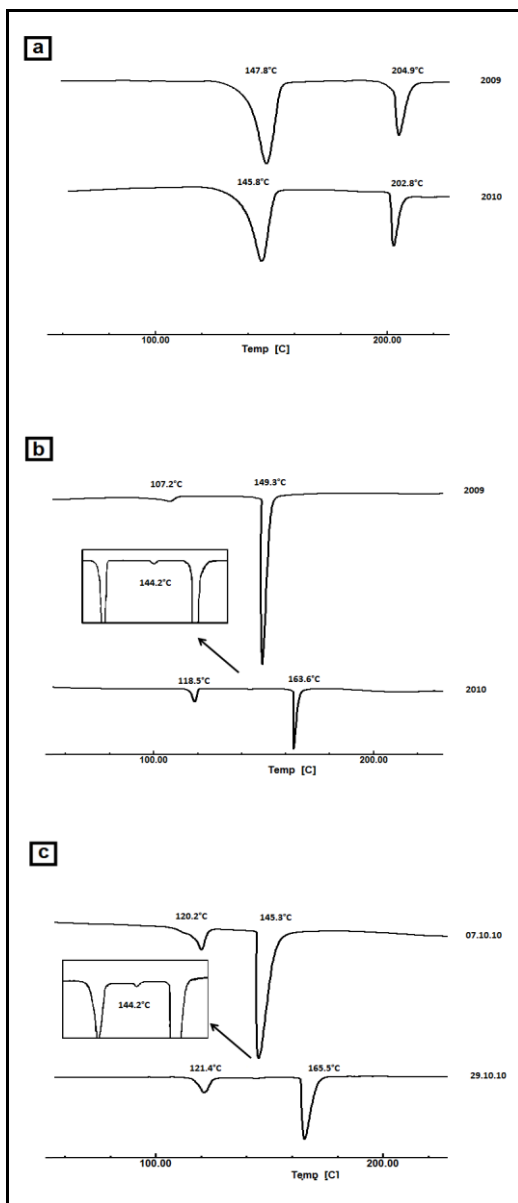


Figura 17 - Curvas de DSC das diferentes formas cristalinas de FLV em diferentes períodos de tempo. a) FLV-MP b) FLV-USP c) FLV-EOH





temperaturas (50 e 80°C), os resultados demonstraram que FLV-MP não apresentou mudanças estruturais até 80°C (Figura 18a). Entretanto, para a amostra de FLV-EOH foram observadas modificações sutis nas intensidades das reflexões entre 10-15 em 2theta (figura 18b). As linhas ficaram mais largas, não sendo possível identificar quais seriam as formas cristalinas envolvidas.

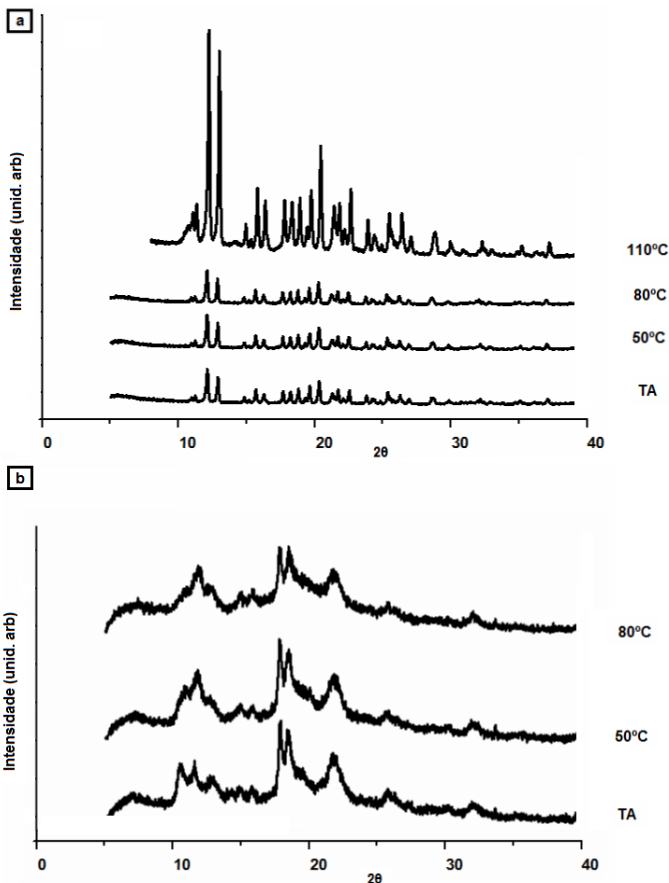


Figura 18 - Padrões de Difração de Raios X das diferentes formas cristalinas de FLV após tratamento térmico em diferentes temperaturas. a) FLV-ACN; b) FLV-EOH

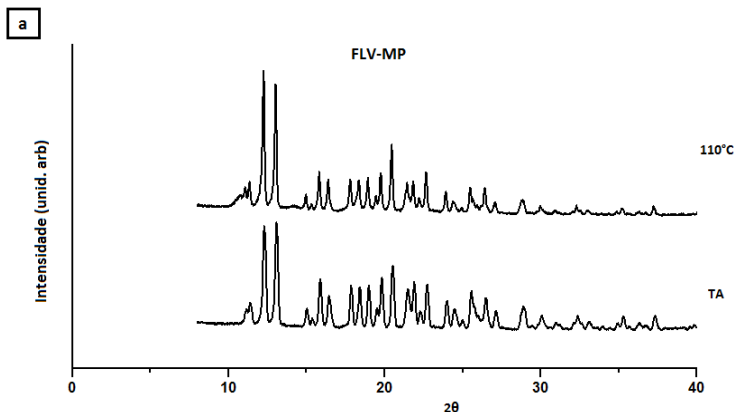


Figura 19 - Padrões de Difração de Raios X de FLV-MP após tratamento térmico em DSC a 110°C

Com o objetivo de verificar as estruturas cristalinas das amostras nas temperaturas onde se observou que as perdas de massa poderiam ser atribuídas à saída de água fortemente ligada, foram realizadas análises de DRX após submeter as amostras de FLV-MP à temperatura de 110°C. Observou-se que à 110°C a perda de água se produz sem mudança da estrutura cristalina (Figura 19). Entretanto, após 20 min a essa temperatura de 110°C já se percebe início de um processo de degradação que foi verificado por CLAE. Entretanto, a amostra de FLV-EOH quando submetida pelo período de uma hora a 80°C se transformou completamente na forma cristalina da FLV-MP. Isto foi verificado por DRX e DSC e pela espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS RMN sólido como se observa na figura 19. Após o tratamento térmico, o espectro  $^{13}\text{C}$  CP/MAS RMN de FLV-EOH (Figura 20) evidencia a perda do solvente, etanol. Possivelmente com a perda de solvente ocorre uma transição à forma cristalina mais estável.

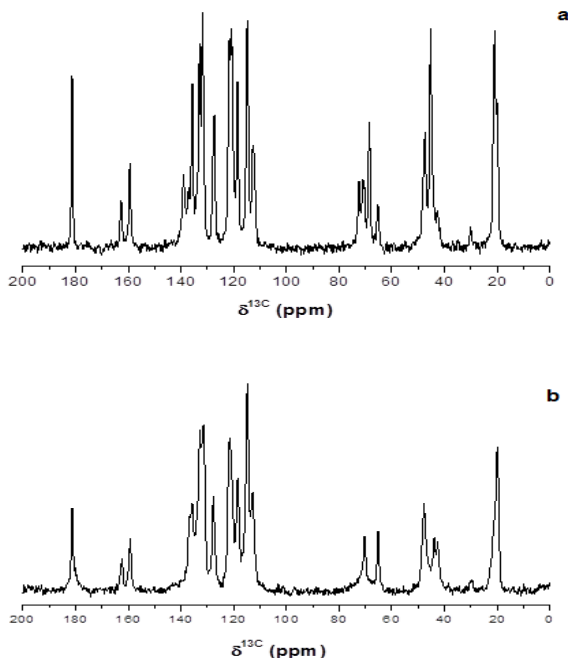


Figura 20 - Espectros  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR sólido de a) FLV-EOH b) FLV-EOH depois de uma hora a  $80^\circ\text{C}$

O estudo das propriedades de estado sólido das amostras FLV-MP, FLV-USP, FLV-EOH e FLV-ACN e análise dos dados permite chegar às seguintes conclusões.

Com as evidências das diferentes técnicas utilizadas pode-se afirmar que a FLV sódica apresenta polimorfismo. Identificando-se as amostras FLV-MP e FLV-ACN como forma I sendo diferente da FLV-USP que seria a forma II. Entretanto FLV-EOH apresenta uma mistura de fases.

A forma I apresenta uma boa cristalinidade evidenciada pelos padrões de DRX e morfologia pelo MEV, e na sua estrutura cristalina estaria presente uma única molécula inequivalente na unidade assimétrica. Esta forma I é estável com o tempo e com temperaturas até  $110^\circ\text{C}$  não havendo mudança em sua estrutura cristalina, apenas iniciando um processo de degradação a essa temperatura com o tempo (20 min). O conteúdo de água (4-5%)

não mudou significativamente após um ano, entretanto por DSC-TG observou-se que se trataria de água fortemente ligada o que permitiria concluir que a forma I é um hidrato da FLV. Embora FLV-MP e FLV-ACN tenham apresentado a mesma estrutura cristalina ou forma I, tais amostras demonstraram comportamentos diferentes na VDI. A FLV-MP apresentou maior velocidade de dissolução. Estes resultados evidenciam que no caso da FLV não apenas o polimorfismo, mas também a morfologia das partículas ou o maior grau de ordem na rede poderia modificar sua dissolução. Embora seja um fármaco de Classe I, com alta solubilidade, pode ser modificada sua velocidade de dissolução, provocando uma diminuição, aparentemente com a morfologia ou hábito cristalino e com uma maior ordem na rede.

A forma II que foi identificada no padrão da USP é altamente higroscópica em condições ambientais, chegando a incorporar mais de 9 % de água. Pelas evidências de DSC-TG também se trataria de um hidrato, mas que apresenta mudanças significativas com o tempo. Possivelmente devido a uma progressiva hidratação sem ocorrer degradação.

A FLV-EOH seria uma mistura de fases, uma delas, a forma I, e outra que apresenta alta desordem na rede cristalina evidenciado por varias técnicas. Esta desordem ocorre, provavelmente, devido a um altíssimo conteúdo de água, mais de 16%, fortemente ligada, mas também pela presença de solvente (etanol). Portanto, a outra fase da mistura poderia ser um solvato com conteúdo de etanol e água. Essas características, principalmente a desordem, explicaria sua velocidade de dissolução. Com o tempo e temperatura, esta amostra apresenta mudanças na estrutura cristalina. O efeito de aquecer por uma hora a 80°C provoca a perda do etanol e observou-se uma transição completa à forma I, mas continua apresentando um alto grau de desordem. É válido salientar que a forma I de FLV, mesmo sendo higroscópica, possui uma estrutura cristalina mais estável, diferente da Forma II, que ao absorver água demonstrou alterações em sua caracterização.

### 6.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS – CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

De acordo com os resultados da caracterização de FLV no estado sólido obtidos através das análises de DRX e FT-IR, observou-se que FLV apresenta duas formas cristalinas, então denominadas FLV-ACN e FLV-USP. Ainda com o uso de técnicas espectroscópicas Raman e RMNN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido na análise da amostra submetida a cristalização em etanol, FLV-EOH, foi possível observar que a amostra apresenta uma mistura de fases e que FLV-MP apresenta resultados coincidentes com FLV-ACN.

Após análise comparativa entre os padrões de DRX fluvastatina sódica relatados em diversas patentes (Van der Schaaf, BLATTER, SZELAGIEWICZ, 2008; PANDA; DRIVASTANA, BAHADUR, 2009) e os padrões reportados no nosso trabalho, pode-se concluir que FLV-MP e FLV-ACN correspondem à forma cristalina designada Forma racêmica I monohidrato relatada na patente dos EUA 6.124.340 (PANDA; DRIVASTANA, BAHADUR, 2009). Além disso, FLV-USP pode ser identificada como uma forma cristalina de (3R, 5S)-enantiômero designado como Forma A na patente dos EUA 6.858.643 B2 (VAN DER SCHAAF, et al., 2005). No entanto, a forma D relatada na patente dos EUA 003.266 A1 (HORVATH, 2000), preparada sob condições padronizadas de umidade, exibe picos no padrão de DRX que estão em concordância com o padrão de FLV-USP. Devido à ambiguidade da nomenclatura utilizada em tais patentes, decidiu-se designar como polimorfo de FLV-MP e FLV-ACN, como forma I e o polimorfo de FLV-USP como forma II. É notável que a Forma A e Forma D descritas nas patentes EUA 6124340 (PANDA; DRIVASTANA, BAHADUR, 2009) e dos EUA 003.266 A1 (Horvath, 2000), respectivamente, são relatados como mistura racêmica. Enquanto isso, a Forma A, na patente EUA 6858643 B2 (VAN DER SCHAAF et al., 2005), corresponde a um enantiômero puro. Portanto, a forma I pode corresponder a um composto racêmico. No entanto, para a forma II, os resultados não apresentam clareza para distinguir entre conglomerado ou um composto racêmico.

Com relação a um rigoroso controle das condições de armazenamento no caso de um medicamento que possui forte tendência para a incorporação de água, o teor de água pode ser

um desafio, em especial em locais como Florianópolis (Brasil), onde a umidade relativa varia entre 60% e 80% dependendo da época do ano (BOTT, OLIVEIRA, 2007). Todas as formas de FLV estudadas neste trabalho foram identificadas como hidratos. A afinidade de hidratação de FLV pode ser analisada levando-se em consideração também os grupos químicos presentes nas moléculas (INFANTES, CHISHOLM, MOTHERWELL, 2003). FLV possui em sua estrutura um íon sódio, um grupo carboxilato, dois grupos hidroxila e um átomo de flúor. Cada um destes grupos possui afinidade para a hidratação, respectivamente, 51,8%, 34,7%, 12,7% e 3,5%. Dessa forma, esta molécula tem uma grande capacidade e / ou tendência para incorporar água em sua estrutura cristalina. Ao consultar a Base de dados cristalográfica de Cambridge (CSD) (com restrições: apenas orgânicos, sem pó,  $R < 10\%$ ), dos compostos que contém um grupamento carboxila com um íon de sódio, observam-se 189 entradas sendo que 130 destas contém moléculas de água. Consequentemente, este tipo de composto apresenta, pelo menos, a possibilidade de 69% de conter água em sua estrutura cristalina.

Portanto, os resultados da caracterização do estado sólido e as análises de afinidade corroboram para a identificação de FLV Forma I como sendo monohidrato e a Forma II um hidrato com o conteúdo de água variável. FLV-EOH apresenta uma mistura das formas sólidas, de uma fase mais desordenada ou desordenado com solvente (etanol / água) na rede cristalina. As análises de FLV-EOH mostram que o solvente foi incorporado na sua estrutura. A desordem apresentada pode ser devido ao conteúdo de água muito elevado, superior a 16%, mas também pela presença de solvente (etanol). Portanto, uma outra fase de mistura pode ser um solvato com etanol e água.

A avaliação dos resultados obtidos com a análise de VDI possibilita afirmar que a VDI de FLV pode sofrer modificações não só pela estrutura cristalina, mas também por outras características do estado sólido tais como morfologia. Observou-se diferença nos resultados da VDI de FLV-MP e FLV-ACN, que embora apresentem a mesma estrutura cristalina, o hábito cristalino das amostras é diferente.

No início dos estudos de caracterização as amostras foram analisadas pelas técnicas de DSC e DRX apresentando diferenças em suas reflexões dos padrões de DRX, evidenciando que existem três diferentes formas cristalinas de FLV. As

análises de DSC das mesmas amostras estão em concordância com os resultados de DRX, uma vez que, as três formas apresentam curvas térmicas diferentes. Os padrões de DRX de FLV-MP e FLV-USP demonstram que ambas são amostras cristalinas, mas FLV-EOH, devido ao alargamento das linhas evidencia a presença de uma forma ou de uma mistura de formas sólidas mais desordenadas do que as outras.

Após o período de um ano, a amostra de FLV-MP não apresentou diferença nos resultados da análise térmica. No entanto, após o mesmo período de tempo, foram observadas alterações significativas no material de referência, FLV-USP, relacionada com as temperaturas de ponto de fusão e valores de entalpia. Além disso, o padrão de DRX confirmou modificações estruturais cristalinas.

A amostra cristalizada, FLV-EOH, em apenas 22 dias apresentou alterações tanto nas curvas de análise térmica como nos padrões de DRX. As análises de FLV-EOH não foram conclusivas, pois os padrões de DRX apresentaram linhas ampliadas e sobreposição de linhas, não sendo possível confirmar se FLV-EOH possui forma cristalina pura ou uma mistura de várias formas. Portanto, é aconselhável combinar os dados de DRX com outras técnicas.

No caso de o material de referência, FLV-USP, é importante salientar que as curvas de DSC, em 2009, apresentaram dois picos endotérmicos e, após um ano, o número de picos endotérmicos (três), as temperaturas do ponto de fusão e as suas entalpias mudaram significativamente. Depois do mesmo período de tempo, a modificação química detectadas nesta amostra foi somente devido ao aumento do teor de água de 9,21%. Este resultado estaria de acordo com a informação sobre patentes de hidrato de modo que pudesse ser confirmada a variação do teor de água muito elevada, apesar de a amostra ter sido armazenada nas condições recomendadas. As análises dos padrões de DRX também evidenciam o aumento do teor de água na mudança das reflexões dos padrões. Além disso, a linha de ampliação observada seria devido ao efeito de desordem de água no sólido.

Realizaram-se técnicas termoanalíticas combinadas com DRX e RMNes com intuito de verificar alterações na estrutura dos cristais e estimar a resistência de ligação de água no sólido cristalino. Assume-se que as moléculas de água estejam

fortemente ligadas ou sejam águas estruturais (hidratos) caso as transições de estrutura cristalina ou modificações físico-químicas ocorram a uma temperatura abaixo de 120 °C em que foi detectada a perda de massa em cada amostra. Em contraste, não havendo mudança de uma ligação fracamente de água ou água absorvida seria confirmada. Portanto, a perda de massa (0,4%) a baixas temperaturas entre 31,9-44,9°C pode ser apenas água fracamente ligada, uma vez que não causou qualquer modificação estrutural no cristal. Após o tratamento a 110 °C foram analisadas as amostras por DRX e HPLC. Os resultados demonstraram degradação química, confirmada por HPLC, e a presença de uma forma amorfa por DRX. Determinou-se o conteúdo de água de FLV-MP pelo método de Karl Fischer, tendo como resultado 3,93% de teor de água. Sendo assim, no intervalo entre 109,2-126,5 °C, a perda de massa (3,6%) pode ser interpretada como uma parte da perda de moléculas de água fortemente ligadas ou água estrutural e, também, degradação química. É evidente que as moléculas de água de FLV-MP se perderam em temperaturas acima de 100 °C, de modo que estas estão fortemente ligadas e / ou em posições estruturais do cristal. Por conseguinte, estes resultados demonstram que FLV-MP é uma forma de hidrato.

Com objetivo de avaliar possíveis mudanças no estado sólido a amostra FLV-EOH foi submetida a tratamento térmico a 80°C pelo período de uma hora. Os resultados obtidos com as análises de DRX não foram conclusivos, pois é possível perceber sobreposição e alargamento das linhas nos padrões de DRX, que salientou a necessidade de realizar avaliação da amostra por espectroscopia de RMN <sup>13</sup>C CP/MAS sólida. Em temperatura ambiente o espectro de RMN de FLV-EOH apresentou sinais atribuídos à presença do solvente etanol, na forma sólida. No entanto, após o tratamento térmico a 80°C, os espectros de RMN <sup>13</sup>C CP/MAS apresentaram uma completa transformação da forma sólida e o seu espectro foi o mesmo da amostra FLV-MP em temperatura ambiente, o que indica que a perda de moléculas de etanol pode provocar uma transformação do solvato para a forma mais estável. No caso do FLV-EOH, a perda de massa que ocorre a baixas temperaturas (35,4-46,7) é de 2,6% que pode ser atribuída à perda de etanol e / ou água molecular.



## **CAPÍTULO II**

### **Estudos de Estabilidade**

---



## 7 REVISÃO DA LITERATURA

### 7.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

O propósito do estudo de estabilidade é prover evidência de como a qualidade de um fármaco varia com o tempo sob influência de uma variedade de fatores, e estabelecer um período de re-teste para a substância ou a vida de prateleira do produto, recomendando as condições de estocagem (ICH, 2003). Pode também ser definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (BRASIL, 2005).

Diversos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, incluindo a estabilidade da substância ativa; potencial de interação entre as substâncias ativas e excipientes; processo de produção; forma farmacêutica; sistema fechamento/embalagem; condições ambientais durante o transporte, estoque e comercialização e tempo entre a produção e uso. Propriedades ambientais tais como aquecimento, luz e umidade, bem como fatores químicos, tais como, oxidação, redução, hidrólise e racemização, possuem grande importância na estabilidade de produtos farmacêuticos (KOMMANABOYNA, RHODES, 1999).

As alterações podem ser rápidas ou lentas e podem levar à perda parcial ou total da atividade, destacam-se a perda da substância ativa - ou o aumento na concentração da mesma em casos especiais; a alteração da sua biodisponibilidade; a perda na uniformidade de conteúdo; problemas microbiológicos; modificações na aparência, palatabilidade e características físicas; formação de produtos tóxicos, dentre outros. Desta maneira, sugere-se que as reações de desestabilização dos medicamentos ocorrem tanto por ação direta sobre a molécula do fármaco, quanto por efeito indutivo/protetor de alguns componentes do sistema nas diversas formas farmacêuticas – sólidas, semi-sólidas ou líquidas (CARSTENSEN, RHODES, 2000; YOSHIOKA, STELLA, 2000).

Neste contexto, os excipientes exercem papel importante nestas reações, principalmente quando há água na molécula ou

sua hidrofiliçidade é elevada. Acredita-se que a água de cristalização propicie a hidrólise do fármaco, enquanto que o aumento da lipofiliçidade do sistema predisponha a formação de uma monocamada de fármaco mais suscetível à instabilidade química (YOSHIOKA, STELLA, 2000; STANISZ et al., 2010).

As reações de degradação de fármacos ocorrem mais facilmente em solução, em virtude da maior mobilidade molecular neste estado. Porém, realizar o controle da estabilidade das formas no estado sólido torna-se muito importante em etapas de desenvolvimento de formulações e produção de medicamentos. A biodisponibilidade de fármacos pode ser modificada em função de alguns fatores relacionados a mudanças no estado sólido, como por exemplo: interconversão polimórfica, desolvatação de solvatos, formação de hidratos e ainda mudanças no grau de cristalinidade (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001).

Encontram-se na literatura alguns estudos sobre a estabilidade de FLV em solução, que relatam a interconversão hidroxíácido dependente do pH do ambiente com deslocamento do equilíbrio químico para a formação do hidroxíácido biologicamente ativo (GRABARKIEWICZ et al., 2006). Outros estudos relatam a instabilidade fotolítica do fármaco e a elucidação estrutural de seus produtos de degradação (MIELCAREK, GROBELBY, OSMALEK, 2009; MIELCAREK et al., 2005; CERMOLA et al., 2007). Estudos de estabilidade no estado sólido não foram encontrados na literatura.

## 7.2 ESTUDOS DE ESTABILIDADE – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade da formulação em permanecer com suas características químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas (KOMMANABOYNA, RHODES, 1999). As especificações, os limites e os métodos de análise para o fármaco podem ser influenciados pelos resultados destes estudos (SIMON, VEVERKA, OKULIAR, 2004).

A instabilidade de um produto pode afetar a eficácia, a segurança ou a aceitabilidade do mesmo pelos pacientes. Ao se falar em eficácia, o efeito mais evidente seria a diminuição da potência do fármaco. Mesmo existindo exceções, considera-se 90% do valor declarado como potência ou o teor mínimo

aceitável de um produto. Para fármacos cujos produtos de degradação apresentem determinada toxicidade, o aumento no teor desses produtos de degradação se torna mais importante do que a diminuição na potência do fármaco (KOMMANABOYNA, RHODES, 1999).

A estabilidade de um medicamento é afetada por diversos fatores, incluindo a estabilidade da própria substância ativa (propriedades físicas e químicas), o potencial de interação entre substância ativa e excipiente, os processos de produção, a forma farmacêutica, o recipiente de armazenamento e as condições ambientais (temperatura, umidade, luz, gases atmosféricos e pressão), presentes durante a produção e o armazenamento do produto até o seu uso. Solventes, trocas de pH, interações e contaminação microbiológica também podem provocar alterações (O'DONNELL, BOKSER, 2006; BRASIL, 2005; NUDELMAN, 1975).

Alguns fatores químicos também podem ocasionar a degradação, como incompatibilidades, oxidações, reduções, hidrólise e racemizações, os fatores ambientais de temperatura, umidade e luz podem dar início ou acelerar essas reações químicas (O'DONNELL, BOKSER, 2006).

Os estudos de estabilidade podem ser classificados como estudos acelerados, estudos de acompanhamento ou estudos de longa duração. A sua aplicabilidade está relacionada à possibilidade de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005). A tabela 8 apresenta os diferentes tipos de estudos de estabilidade preconizados pelo Guia de Estudos de Estabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005).

Tabela 8 - Descrição das condições dos estudos de estabilidade recomendados pela ANVISA para avaliação da estabilidade de medicamentos.

<b>Estabilidade</b>	<b>Acelerada</b>	<b>Longa Duração</b>	<b>Acompanhamento</b>
<b>Condições</b>	40 °C ± 2 °C / 75% ± 5% UR	30 °C ± 2 °C / 65% ± 5% UR	Câmaras climáticas (controle de temperatura e umidade)
	Condições forçadas de armazenamento	Antes e após prazo de validade esperado	Análises periódicas de doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução e pH*
	Avaliar impacto de curtas exposições (ex: durante o transporte)	Estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar condições de armazenamento	Verificar se o produto mantém as características

### 7.3 ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE

A pesquisa dos mecanismos de degradação e a avaliação de potenciais produtos de degradação que não seriam observados em estudos acelerados ou de longa duração, utilizam como recurso a degradação forçada, permitindo realizar a determinação do efeito produzido em um produto farmacêutico sob condições extremas de degradação, as quais excedem

aquelas utilizadas em estudos acelerados (KLICK et al., 2005; ICH, 2003; REYNOLDS et al., 2002).

Nos estudos estresse os fármacos e produtos farmacêuticos podem ser submetidos aos seguintes mecanismos de degradação: degradação térmica, decomposição por hidrólise, decomposição oxidativa e fotólise (REYNOLDS et al., 2002).

As reações fotoquímicas, muito comuns em fármacos, podem ser consideradas como processos complexos, pois a maioria destes apresentam máximos de absorção na região de comprimento de onda das fontes de radiação que são utilizadas nos estudos, como a ultravioleta (NUDELMAN, 1975). Diferentes tipos de reações como redução hidrólise, oxidação, isomerização, alteração de anel, polimerização e remoção de substituintes podem ser desencadeadas por ação da luz (TONNESEN, 2001).

Os estudos de fotoestabilidade podem ser realizados em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios. Com a primeira etapa tem-se o objetivo de avaliar a fotoestabilidade da substância ativa de seus respectivos produtos de degradação, analisando o fármaco isoladamente ou em solução/suspensão, e submetendo o mesmo a diversas condições de exposição. Já com a segunda etapa, ou testes confirmatórios, obtêm-se informações necessárias sobre a manipulação e embalagem do produto (ICH, 1996; TONNESEN, 2001).

Segundo o guia do ICH (1996), são preconizados dois tipos de fontes de radiação para os estudos de estabilidade:

- ✓ fonte com emissão padrão similar ao D65 (luz do dia externa)/ID65 (luz do dia indireta), que pode ser obtida com lâmpadas fluorescentes combinadas com lâmpadas que emitem luz UV ou visível, xenônio ou metal-haletos, contendo filtros que permitam emissão próxima de 320 nm;
- ✓ lâmpada branca fluorescente fria e fonte de luz UV fluorescente, que possua uma distribuição espectral de 320 a 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm.

## 7.4 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Segundo o ICH (2006), a pureza de fármacos corresponde a um importante parâmetro no controle de qualidade e é analisada sob duas perspectivas: a segurança e os aspectos químicos. A primeira avalia a utilização da presença de uma substância possivelmente tóxica ou incompatível com a formulação em produtos farmacêuticos finais. Já os aspectos químicos envolvem a classificação e identificação das impurezas verificadas em procedimentos analíticos, bem como sugerem a sua origem.

A utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância, e pode fornecer elementos importantes para a análise da biocompatibilidade dos diferentes materiais (ROGERO et al., 2003).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (GUESS et al., 1965, ROGERO et al., 2000). Estes testes podem detectar a ocorrência de lise das células, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas (DAGUANO, SANTOS, ROGERO, 2007).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996).

## 7.5 ESTUDOS DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

O desenvolvimento de estudos de estabilidade exige um conhecimento teórico das reações de degradação e dos



princípios da cinética química, além de uma ampla pesquisa dos procedimentos adequados para a realização dos ensaios de estabilidade, em virtude das reações de degradação nos fármacos e medicamentos ocorrer a velocidades definidas e serem de natureza química, podendo sofrer alterações através do aumento da temperatura (NETZ, ORTEGA, 2002; LACHMAN, DELUCA, AKERS, 2001; NUDELMAN, 1975).

Muitos objetivos podem ser alcançados com os estudos de cinética de degradação, como por exemplo, a obtenção experimental de dados cinéticos, proposição do mecanismo de reação, planejamento de experimentos necessários para confirmação das hipóteses propostas e ainda o estabelecimento de condições para acelerar ou diminuir a velocidade de reação conforme a necessidade. A obtenção de uma maior estabilidade em formulações instáveis pode ser auxiliada pelo conhecimento do mecanismo de degradação (NUDELMAN, 1975).

A avaliação da velocidade e a ordem da reação são fatores intimamente ligados que envolvem os princípios da cinética química. Vários fatores afetam a velocidade de reação: temperatura, solventes, agentes catalíticos ácidos e básicos e a luz (MARTIN, 1993). A variação da velocidade de reação em função da concentração dos reagentes é definida pela determinação da ordem de reação (LACHMAN, DELUCA, AKERS, 2001). As reações mais importantes nos estudos de degradação são as reações de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem, embora estas últimas sejam mais raras (CARSTENSEN, RHODES, 2000). Nas reações de ordem zero a velocidade de reação independe da concentração dos reagentes, diferente das reações de primeira ordem, onde a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. Já nas reações de segunda ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência de um deles (NUDELMAN, 1975). Nas reações de ordem zero considera-se como fator limitante, por exemplo, a solubilidade ou a absorção da luz em certas moléculas fotossensíveis.

Na prática, a determinação da ordem de reação pode ser realizada através de representações gráficas que devem relacionar a concentração do fármaco em função do tempo (ordem zero); do logaritmo da concentração em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração em função do

tempo (segunda ordem). A ordem da reação é definida pela escolha da representação gráfica que fornecer a melhor reta (NETZ, ORTEGA, 2002; NUDELMAN, 1975).

Com a determinação da ordem e da velocidade de reação há a possibilidade de se obter outros dados característicos dos estudos de estabilidade, como por exemplo, o  $t_{90\%}$ , que representa o tempo em que a concentração do fármaco leva para atingir 90% da sua concentração inicial, considerado como indicativo de vida útil (WIGENT, 2006; LACHMAN, DELUCA, AKERS, 2001; NUDELMAN, 1975).

Os modelos cinéticos podem ser representados pelas equações apresentadas na Tabela 9 (CARSTENSEN, RHODES, 2000; NUDELMAN, 1975).

Tabela 9 - Equações de cinética de degradação.

Ordem da reação	Equações	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$
Zero	$C = C_0 - kt$	$t_{50\%} = C_0/2k$	$t_{90\%} = 0,1 C_0/k$
Primeira	$\log C = \log C_0 - kt$	$t_{50\%} = 0,693/k$	$t_{90\%} = 0,106/k$
Segunda	$1/C = 1/C_0 - kt$	$t_{50\%} = 1/k C_0$	$t_{90\%} = 1/9k C_0$

Onde:  $C_0$  é a concentração do fármaco no tempo zero;  $C$  é a concentração do fármaco após degradação por um tempo  $t$ , e  $k$  é a constante de reação.

Os métodos de envelhecimento acelerado consideram a temperatura responsável por acelerar a maioria dos processos de degradação de fármacos e medicamentos (NUDELMAN, 1975). A relação proposta por Arrhenius é um dos métodos que expressa a influência da temperatura sobre a velocidade de reação. Através de uma equação matemática característica torna-se possível realizar a determinação do tempo de vida útil do fármaco ou medicamento (GIL-ALEGRE et al., 2001; LACHMAN, DELUCA, AKERS, 2001; NUDELMAN, 1975).

A Equação de Arrhenius é representada abaixo,

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Onde,

K = constante de velocidade  
A = constante de Arrhenius (fator pré-exponencial)  
Ea = energia de ativação  
e = base dos logaritmos neperianos ( $e = 2,71828$ )  
R = constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )  
T = temperatura absoluta (kelvin)

## 7.6 ESTABILIDADE DA FLUVASTATINA

A estabilidade das estatinas vem sendo investigada nos últimos anos enfocando, principalmente, a fotoestabilidade e a interconversão hidroxilácido-lactona pH dependente destes fármacos. Em relação à fotoestabilidade, Mielcarek e colaboradores (2005) realizaram estudos para investigar a cinética de fotodegradação da FLV em soluções aquosas e metanólicas do fármaco, quando submetidas à luz com espectro de emissão em 365 nm. A degradação da FLV seguiu a cinética de pseudo-primeira ordem, sendo que o fármaco foi mais sensível à degradação em solução aquosa. Com base nos resultados obtidos por CLAE acoplada à espectrometria de massas os autores sugerem a formação de dois produtos de fotodegradação (Figura 21), sendo um deles o isômero cis da FLV. Em 2009, MIELCAREK, NASHRENT e GROBELNY separaram três fotoprodutos por cromatografia de alta eficiência em camada delgada, utilizando as condições anteriormente descritas.

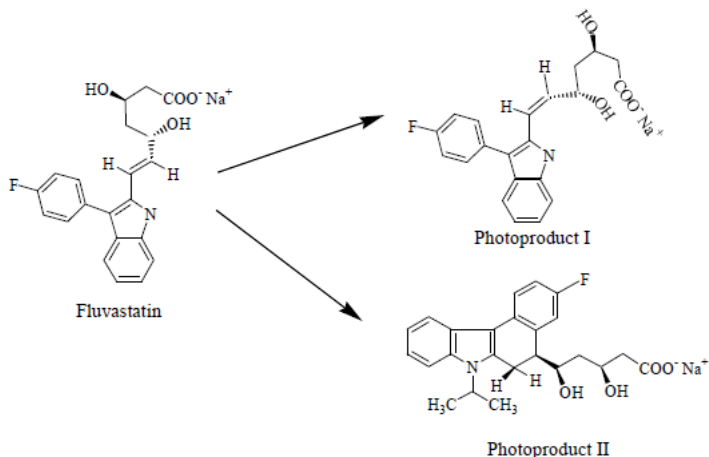


Figura 21 - FLV e produtos de fotodegradação (MIELCAREK et al., 2005)

Com outro enfoque, vários estudos envolvendo a estabilidade frente à luz têm sido realizados, com o objetivo identificar os produtos de transformação das estatinas em águas superficiais, avaliando o risco associado à liberação destes fármacos no ambiente aquático. Estes fármacos são considerados como poluentes emergentes do ecossistema aquático, pelo seu alto consumo. Dentre as estatinas que têm sido avaliadas nestes estudos encontram-se a lovastatina, a sinvastatina, a rosuvastatina, a pitavastatina, a atorvastatina e a FLV (MIELCAREK et al., 2005; CERMOLA et al., 2006; ASTARITA et al., 2007; CERMOLA et al., 2007; GROBELNY et al., 2009; KRACUN et al., 2009; MIELCAREK, GROBELNY, OSMALEK, 2009a; MIELCAREK, NASHRENT, GROBELNY, 2009b).

Neste contexto, CERMOLA e colaboradores (2007) investigaram os processos de transformação fotoquímica da FLV em água e relataram a elucidação da estrutura dos principais fotoprodutos (Figura 22), identificados como derivados dihidrobenzocarbazol, benzocarbazol, azonana-2,7-diona e espiro[4,4] azononana) da FLV.

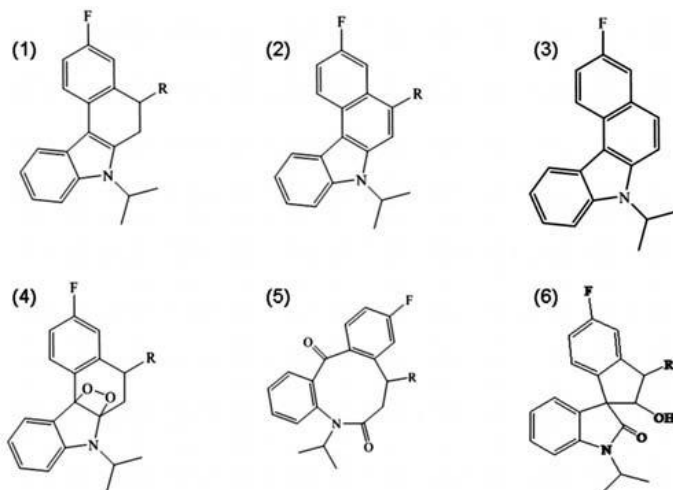


Figura 22 - Produtos de fotodegradação (CERMOLA et al., 2007).

Alguns estudos indicam que a administração concomitante de estatinas com ácidos carbonados resultaram na diminuição da biodisponibilidade devido à instabilidade deste grupo de fármacos em meio ácido. Destaca-se o caso de comprimidos de pravastatina sódica, nos quais a incorporação de óxido de magnésio à formulação aumentou o pH do sistema e promoveu a estabilização do fármaco (YOSHIOKA, STELLA, 2000). Este mecanismo provavelmente envolveu a interconversão hidroxiácido-lactona dependente do pH do ambiente. As formas hidroxiácidas e lactônicas coexistem em equilíbrio *in vivo*, no entanto, acredita-se que apenas a primeira seja biologicamente ativa. Exceto pela lovastatina e sinvastatina, todos os outros fármacos do grupo são administrados somente nesta forma (HOFFMANN, NOWOSIELSKI, 2008; GRABARKIEWICZ et al., 2006).

Grabarkiewicz e colaboradores (2006) estudaram a interconversão hidroxiácido-lactona da FLV em função do pH, determinando as barreiras termodinâmicas associadas à formação destas formas correspondentes (Figura 23). Os autores verificaram que, em meio ácido, o sistema existe em equilíbrio, enquanto que em condições básicas ocorre deslocamento do equilíbrio para a formação do hidroxiácido biologicamente ativo. Embora este seja um mecanismo determinante na estabilidade das estatinas, diferenças estruturais fazem com que a

estabilidade dos fármacos seja diferente quando comparados entre si. Por exemplo, sugere-se que a FLV seja mais estável que a atorvastatina devido à existência de ligações duplas que proporcionam uma maior rigidez molecular, bem como devido a maiores barreiras energéticas à hidrólise (HOFFMANN, NOWOSIELSKI, 2008).

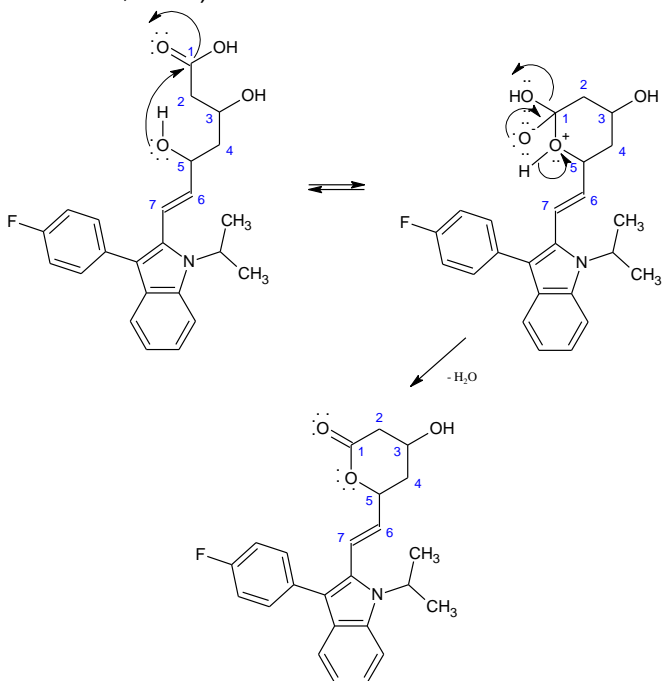


Figura 23 - Mecanismo de lactonização do grupo hidroxycido da FLV (adaptação de GRABARKIEWICZ et al., 2006).

Com o objetivo de se alcançar uma melhor estabilidade física e química de estatinas, alguns estudos têm sugerido a utilização de diferentes matrizes poliméricas que podem, por sua vez, modificar o padrão de interações através de pontes de hidrogênio. Papageorgiou e colaboradores (2009) demonstraram que a utilização de quitosana, polivinilpirrolidona e eudragit em formulações contendo FLV proporcionaram maior estabilidade do fármaco em estudos de estabilidade acelerada. As amostras foram acondicionadas em *vials* de PVC por um período de 24 meses à temperatura de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 5\%$ . Segundo os autores, a principal razão para este fenômeno são

as interações entre os grupos reativos dos polímeros e a carbonila e as hidroxilas da FLV (PAPAGEORGIOU et al., 2009).

A estrutura cristalina é outra característica determinante na estabilidade de fármacos no estado sólido (BUCKTON, 2005). Algumas técnicas que promovem incremento na solubilidade do fármaco, como a micronização, podem produzir matérias-primas amorfas com graus de desordem diferenciados, levando a diferenças na estabilidade do pó obtido. Essas características foram observadas em estudo realizado utilizando sinvastatina (GRAESER et al., 2008). Estudos de degradação das diferentes formas cristalinas da FLV não foram encontrados no levantamento realizado. Além disto, estudo recente de avaliação da fototoxicidade de FLV foi realizado por Viola e colaboradores (2010). Os autores avaliaram a citotoxicidade de FLV e seus principais produtos de degradação após exposição à luz UV-A de soluções aquosas contendo FLV (VIOLA et al., 2010).





## **8 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **8.1 MATERIAIS**

Os estudos de estabilidade foram realizados com a fluvastatina matéria-prima (FLV-MP), com grau de pureza de 99,5%, e com as amostras de FLV-MP recristalizadas em etanol (FLV-EOH) e em acetonitrila (FLV-ACN) obtidas através do método de cristalização por resfriamento, conforme indicado no Capítulo I. Os estudos em solução foram realizados apenas com a FLV-MP.

### **8.2 MÉTODOS**

#### **8.2.1 Acompanhamento da degradação**

Para o acompanhamento da estabilidade foram utilizados métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD).

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, com coluna Phenomenex C18 e fase móvel composta por metanol:água (70:30, v/v, pH 3,0) na vazão de 1 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, a detecção compreendeu o comprimento de onda de 238 nm (GOMES,2009). A fase móvel foi preparada misturando-se metanol e água ultrafiltrada (Milli-Q), medidos separadamente e na proporção especificada, o pH foi ajustado com ácido fosfórico. A fase móvel foi filtrada em membrana de Nylon 45 µm, sob vácuo, seguido de banho de ultrassom por 30 minutos.

Para a CCD foram utilizadas cromatoplasas de Sílica-gel (Sorbent Technologies®) e fase móvel constituída de diclorometano:metanol (95:5, v/v), com 2 gotas de ácido acético.

As aplicações consistiram em manchas circulares concentradas (do tipo gota) a partir de solução do padrão e das soluções em análise. As bandas, visualizados em 254 nm, forneceram valores para o cálculo do Índice de Retenção (Rf), conforme demonstrado na equação abaixo, onde dC significa a distância percorrida por um componente da solução e dS, distância percorrida pelo eluente:

$$R_f = \frac{dC}{dS}$$

## **8.2.2 Estudos em Solução**

### **a) Avaliação em diferentes solventes e pH**

O perfil de degradação da FLV em solução, na concentração de 1 mg/mL, foi realizada em diversos diluentes: soluções aquosas (pH 4 e pH 10), metanol e acetonitrila:metanol (1:50, V/V). Para obtenção de soluções aquosas de pH 4 foram utilizados ácido acético, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico para ajuste do pH. Para obter solução pH 10, utilizou-se hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) e hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste do pH. Solução aquosa sem ajuste de pH também foi utilizada, a fim de comparar o efeito isolado da água na estabilidade do fármaco. As soluções foram mantidas em estufa a 60 °C, por 10 dias, sendo realizadas análises periódicas de acordo com as particularidades dos sistemas. O acompanhamento da degradação da FLV foi realizado pela análise por CLAE e CCD de alíquotas coletadas em 1, 2, 3, 6, 24 e 48 horas, e no 4º e 10º dias. As amostras foram preparadas para análise diluindo-se as alíquotas obtidas em metanol (para obter soluções de concentração de 20 µg/mL. Todas as soluções foram analisadas imediatamente após o preparo e antes de serem colocadas na estufa.

### **b) Influência da temperatura**

Soluções de 1 mg/mL do fármaco em água foram expostas às temperaturas de 50 °C, 60 °C e 70 °C em estufa. As tomadas de amostra foram realizadas nos tempos de 1, 2, 3, 6, 24 e 48 horas, e no 4º e 10º dias, sendo que as análises foram realizadas de acordo com o item a.

### **c) Influência da luz ultravioleta (UV)**

Soluções de 1 mg/mL de FLV em água, metanol e acetonitrila:metanol (50:1, V/V) foram colocadas em cubetas de quartzo tampadas e mantidas em câmara de luz UV, com

emissão nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, por 6 horas. A fonte de irradiação de luz UV com emissão de radiação no comprimento de onda de 365 nm é indicada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu guia para estudos de fotoestabilidade (BRASIL, 2005). O mesmo guia também prevê o uso de fontes de irradiação com diferentes comprimentos de onda de emissão, o que justifica a utilização da lâmpada com emissão em 254 nm.

O acompanhamento da degradação da FLV foi realizado pela análise por CLAE e CCD de alíquotas coletadas em 5, 10, 15, 30 e 45 minutos, e em 1, 2, 3 e 6 horas, sendo que as análises foram realizadas de acordo com o item a.

#### **d) Cinética de degradação**

A cinética de degradação foi determinada através da análise da ordem de reação, da constante de velocidade de reação (K) e da energia de ativação (Ea). Para definir a ordem de reação, a quantidade de fármaco degradado nos intervalos de tempo especificados foi determinada e os dados foram distribuídos graficamente, plotando-se a concentração do fármaco em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração do fármaco em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração do fármaco em função do tempo (segunda ordem), calculando-se os coeficientes de correlação (r) (CARSTENSEN, RHODES, 2000; SINGH, BAKSHI, 2000).

Com os valores de K de cada temperatura analisada plotou-se o gráfico de  $\log K$  *versus* o inverso da temperatura ( $1/\text{temperatura}$ ) (Kelvin), obtendo-se a equação da reta. Dessa forma, foi calculada a constante de velocidade de degradação na temperatura de 25 °C (K<sub>25</sub>) e a energia de ativação (Ea) pela equação  $b = -E_a/(2,303 \times R)$ , onde b é o coeficiente angular, e R é a constante universal dos gases perfeitos (1,987 cal.mol).

### **8.2.3 Estudo de Estabilidade no Estado Sólido**

O teste de estabilidade é um procedimento de rotina realizado em fármacos e produtos farmacêuticos, e é empregado em diferentes fases de desenvolvimento farmacêutico. A estabilidade está relacionada não somente à estabilidade química intrínseca da molécula, mas também à forma física,

processo de fabricação, interações entre os componentes da formulação, recipiente e sistemas de fechamento e condições de armazenamento (como temperatura, luz e umidade). Devido as suas propriedades físico-químicas intrínsecas e fácil manuseio, o estado sólido é ainda o estado físico dominante dos fármacos, os quais podem existir em diferentes formas químicas e físicas, como sais, co-cristais, polimorfos, formas anidras ou hidratadas, formas quirais, entre outras (GUO, 2010). Nas duas últimas décadas tem havido um aumento significativo na compreensão mecanicista das características de estado sólido de fármacos. Muitos estudos têm relacionado o comportamento térmico de fármacos no estado sólido, mas a maior parte da informação disponível sobre fotodegradação refere-se a reações em soluções (usualmente aquosa) (GLASS, NOVAK, BROWN, 2004). Poucos estudos têm avaliado o comportamento fotoquímico das estatinas, especialmente a FLV, principalmente no estado sólido (MIELCAREK et al., 2005; MIELCAREK, NASHRENT, GRONBELNY, 2009; CERMOLA, et al., 2007; VIOLA et al., 2010). Neste estudo avaliou-se o comportamento frente à luz de uma matéria-prima obtida comercialmente e duas amostras cristalizadas em solventes amplamente utilizados em estágios finais de cristalização e como co-solventes.

As amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH foram expostas à luz UV, utilizando lâmpada com emissão no comprimento de onda de 365 nm. Cerca de 300 mg de cada amostra foi distribuída uniformemente em vidro de relógio. As amostras foram mantidas a uma distância padronizada de 10 cm da fonte de radiação e aproximadamente 15 mg foram retirados após 1, 2, 3, 5, 7 e 15 dias de exposição. As amostras de FLV foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (GOMES, 2009), para verificar o teor e observar a formação de produtos de degradação; por DRX, para investigar possíveis mudanças nas formas cristalinas, e por citotoxicidade, com o intuito de verificar se os produtos formados possuem alguma toxicidade.

### **8.2.3.1 Análise das amostras por CLAE**

As análises foram realizadas de acordo com as condições já descritas no item 8.2.1.

### **8.2.3.2 Cálculos cinéticos**

A ordem de reação para cada amostra foi determinada graficamente conforme descrito no item 8.2.2 item d.

### **8.2.4 Difração de Raios-X (DRX)**

As amostras foram avaliadas em difratômetro XPERT PANalytical, com CuK, tubo e filtro de Ni, tensão de 45kW e corrente de 40 mA, na faixa de 60-80 (2 $\theta$ ), 0,016 (step) e 30 segundos, equipado com detector X' Celerator.

### **8.2.5 Estudos de citotoxicidade**

Estudos de citotoxicidade das amostras submetidas à luz foram realizados em colaboração com o Laboratório de Virologia Aplicada (CCB/UFSC), sob Coordenação da Prof. Cláudia Simões.

Utilizou-se uma linhagem de fibroblastos de gengiva humana (cultura primária), cultivada à 37°C em atmosfera com umidade controlada de 5% de CO<sub>2</sub>. Minimal Essential Medium - Cultilab® (MEM) foi utilizado como meio de cultura, acrescido de 0,22% de bicarbonato de sódio para que o pH permanecesse entre 7,25 a 7,4. O MEM foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB – Cultilab®), na proporção de 10%, para promoção do crescimento, e 5% para manutenção das linhagens celulares. PSA (10.000 unidades de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B – Cultilab®) na concentração de 1% foi adicionado ao meio para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias, fungos e leveduras. Tripsina (tripsina de pâncreas suíno preparada em solução de EDTA 1:250 Sigma®) foi utilizada como agente dissociante, para a obtenção de subculturas celulares, para manutenção das células e realização dos experimentos.

#### **a) Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT)**

Em uma placa de 96 cavidades (100 µL/cavidade) distribuiu-se uma suspensão de fibroblastos, contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/mL, obtida por tripsinização

de um frasco de cultura celular. A placa foi incubada por 24 h, à 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, com o tapete celular confluyente, o meio MEM foi substituído pelas amostras de FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH, em diferentes concentrações através de diluições sucessivas na razão 1:2, e então a placa foi incubada por 48 h. Após esse período, o meio de cada cavidade foi substituído por 50 µL de uma solução de MTT (1 mg/mL), e a placa foi novamente incubada por 4 h. Então se removeu a solução de MTT e substituiu-se por 100 µL de DMSO/cavidade (Nuclear®). A placa foi submetida à agitação por um período de 10 min, à temperatura ambiente, com o objetivo de dissolver a formazana. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (TECAN®) em comprimento de onda de 540 nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada uma das amostras foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, através da seguinte fórmula:

$$X \% = \frac{DO_{\text{material-teste}}}{DO_{\text{controle celular}}} \times 100$$

Onde: DO = Densidade Óptica

Com os resultados dos percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, plotou-se um gráfico e através da análise de regressão linear calculou-se a CC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração de cada amostra que reduz em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC<sub>50</sub> calculados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO

#### 9.1.1 Avaliação dos métodos de acompanhamento da degradação

O uso de métodos indicativos de estabilidade é obrigatório quando há necessidade da detecção exata e da quantificação dos produtos de degradação. O desenvolvimento destes métodos se inicia com a detecção de produtos de degradação relevantes, oriundos de condições de degradação forçada, que também são formados em ensaios de estabilidade acelerada ou de longa duração. Além da capacidade de resolução e de detecção dos produtos de degradação, o método indicativo de estabilidade deve ser viável para estabelecer as especificações, as condições de armazenamento e o prazo de validade do produto farmacêutico (BAERTSCHI, 2006).

A validação de um método analítico indicativo de estabilidade parte da determinação de sua especificidade frente à análise da substância de interesse e seus produtos de degradação, os quais podem ser formados pela decomposição forçada do composto original. A precisão e a exatidão do método também devem ser avaliadas, aplicando-se os mesmos princípios de validação dos métodos usuais. O desenvolvimento e validação dos métodos analíticos indicadores de estabilidade é justificado pela necessidade de técnicas potenciais para a separação dos componentes de uma mistura física do fármaco e seus produtos de degradação (SINGH, BAKSHI, 2000).

Inicialmente foi testado o método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como alternativa ao método apresentado na Farmacopeia Americana, já que o método farmacopeico preconiza o uso de tampão em diferentes gradientes de concentração como fase móvel. As condições alternativas, avaliadas preliminarmente, foram baseadas em artigos de determinação de FLV em plasma, estudos de estabilidade de FLV e de desenvolvimento e validação de métodos de determinação de estatinas (NAKASHIMA et al., 2001; ERTÜRK, ÖNAL, ÇETIN, 2003; MIELCAREK et al., 2005; UM et al., 2006; CERMOLA et al., 2007; MIELCAREK, NASHRENT, GROBELNY, 2009b; GOMES et al., 2009). Após

definir como critérios de exclusão a utilização de tampões, solventes onerosos e colunas cromatográficas quirais, foram adotadas as condições propostas por Gomes e colaboradores (2009), o qual foi considerado apropriado tendo em vista que apresentou especificidade, linearidade e precisão nos testes de transferência laboratorial de método, conforme resultados apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados de co-validação do método cromatográfico

Precisão Intra-dias		
	Teor (%)	CV
Dia 1	102,59	1,43
Dia 2	101,89	1,78
Dia 3	99,50	0,69
Precisão Inter-dias		
Teor $\pm$ CV	101,33	1,62
Linearidade		
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	4 – 24	
Curva de calibração	$y = 0,0344x - 0,032$ , $r = 0,9997$	
Anova – Regressão Linear	2820,247 ( $p=5\%$ ; 3,1)	
Anova – Desvio da Linearidade	0,382 ( $p=5\%$ ; 3,26)	
Exatidão		
Adicionado	Encontrado	Recuperado
( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
4,0	3,97	99,16
8,0	8,05	100,59
12,0	12,07	100,62
Média (%) $\pm$ CV	100,12 $\pm$ 0,83	

No parâmetro especificidade, demonstrou-se que não há evidências da interferência dos produtos de degradação no método analisado. Além disso, o método demonstrou linearidade visto que as soluções de FLV apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações. Na faixa de concentrações de trabalho, o valor de  $r$  para a curva de calibração obtida foi maior que 0,999 e a Análise da Variância (ANOVA) indicou não haver diferença significativa entre as análises realizadas. O método também se demonstrou preciso, pois o valor do coeficiente de variação para estudos intra e inter-dias foi menor que 2%, sendo que não houve diferença



significativa entre as análises realizadas conforme demonstrado através de análise estatística por ANOVA.

Tendo em vista que o que o método desenvolvido por GOMES et al. (2009) apresentou adequada especificidade e resolução para os produtos de degradação o mesmo foi utilizado nos estudos de estabilidade da FLV.

Além deste método, empregou-se a cromatografia em camada delgada (CCD), adaptando-se técnicas relatadas para separação cromatográfica preliminar de estatinas, bem como avaliando as condições tradicionalmente propostas para este técnica na literatura (CERMOLA et al., 2007). Diversos testes foram realizados variando-se a proporção e composição dos solventes (hexano, isopropanol, acetato de etila, butanol, metanol, diclorometano, tolueno e ácidos). A condição escolhida (fase estacionária: sílica-gel; fase móvel: diclorometano:metanol (95:5 v/v com 0,1 mL ácido acético)) apresentou a melhor resolução entre as bandas da FLV e os produtos de degradação. A CCD foi utilizada como método qualitativo preliminar indicativo de degradação.

Em comparação com a SQR de FLV ( $R_f = 0,34$ ), os cromatogramas das amostras expostas à luz UV apresentaram uma banda principal evidente ( $R_{f1} = 0,42$ ), bem como outras três bandas ( $R_{f2} = 0,51$ ;  $R_{f3} = 0,63$ ;  $R_{f4} = 0,96$ ). Além disso, verificou-se uma maior intensidade das bandas relacionadas à degradação do fármaco em 365 nm (especialmente no caso da banda 4) (Figura 24).

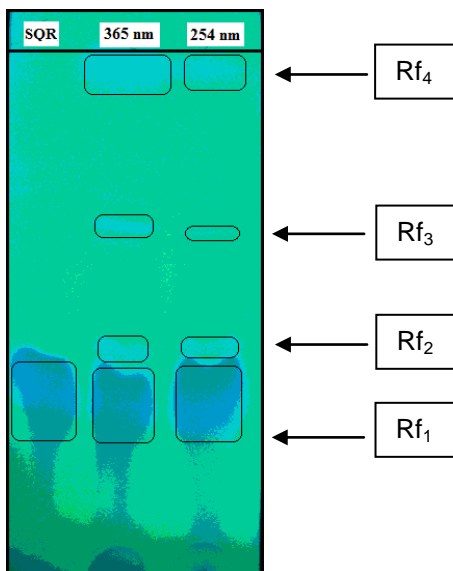


Figura 24 – Representação da cromatoplaça apresentando FLV e seus produtos de degradação presentes na amostra após exposição à luz UV 254 e 365 nm – visualização em UV/254 nm

### 9.1.2 Avaliação em diferentes solventes e pH

As soluções de FLV submetidas às condições ácidas e básicas foram acompanhadas por CLAE, avaliando-se o surgimento de produtos de degradação bem como o decaimento da concentração do fármaco. Conforme descrito na literatura (CERMOLA et al., 2007), a FLV demonstrou maior estabilidade em soluções não aquosas e em condições alcalinas, enquanto que a velocidade de degradação em meio ácido foi superior.

Tabela 11 - Coeficientes de correlação (r) e demais dados obtidos a partir dos gráficos construídos, sendo destacada a ordem da reação para as respectivas condições.

Condição	r			k (% <sup>-1</sup> )	t <sub>90%</sub> (dias)	t <sub>50%</sub> (dias)
	Zero Ordem	1 <sup>a</sup> Ordem	2 <sup>a</sup> Ordem			
CH <sub>3</sub> COOH	0,9754	0,9930	0,9716	$7,7 \times 10^{-2}$	$5,8 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-1}$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,9865	0,9924	0,9753	$2,3 \times 10^{-3}$	1,9	12,5
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,9933	0,9974	0,9782	$3,0 \times 10^{-5}$	1,5	13,9
HCl	0,9881	0,9934	0,1005	$8,0 \times 10^{-4}$	5,5	36,1
NH <sub>4</sub> OH	0,9951	0,9963	0,9970	$7,6 \times 10^{-6}$	6,1	54,8
NaOH	0,9317	0,9428	0,9528	$1,0 \times 10^{-5}$	5,0	45,3
H <sub>2</sub> O	0,9972	0,9967	0,9939	$1,3 \times 10^{-1}$	3,1	15,7
Metanol	0,9576	0,9634	0,9687	$6,8 \times 10^{-6}$	6,9	61,7
Acetonitrila	0,7626	0,9790	0,9839	$9,9 \times 10^{-6}$	4,7	42,1

Enquanto que os sistemas avaliados de FLV em soluções não aquosas (solventes orgânicos) e em soluções de pH básico apresentaram cinética de segunda ordem, ou seja, com degradação dependente da concentração da FLV e do diluente, destacam-se os estudos em soluções ácidas. Nestas, a degradação foi significativa e conduziram a resultados coerentes com a cinética de primeira ordem, na qual a velocidade da reação é influenciada por apenas um dos reagentes (Tabela 11). Desta maneira, pode-se dizer que a cinética desta reação é de pseudo-primeira ordem devido à amplitude da influência dos grupamentos acetato, sulfato, fosfato e cloreto sobre a degradação da FLV, embora a presença do fármaco seja fundamental para a reação (LACHMAN, DELUCA, AKERS, 2001).

Além disso, pode-se comparar os sistemas avaliados com a análise de solução aquosa sem ajuste de pH, utilizada como branco experimental (Figura 26). A inclinação das retas no gráfico e a detecção de 67,6 % de FLV remanescente no branco, após 10 dias de estudo, permitem observar que embora condições ácidas propiciem a degradação do fármaco, acredita-se que os componentes do sistema também interfiram. As soluções ácidas contendo ânions acetato, sulfato, fosfato e cloreto proporcionaram degradação drástica. Diferentemente, a alcalinização das soluções aquosas, com hidróxido de sódio e amônio, exerce efeito protetor e promove decaimento brando das concentrações de FLV, comparável aos resultados obtidos para soluções não aquosas (Figuras 24 a 26).

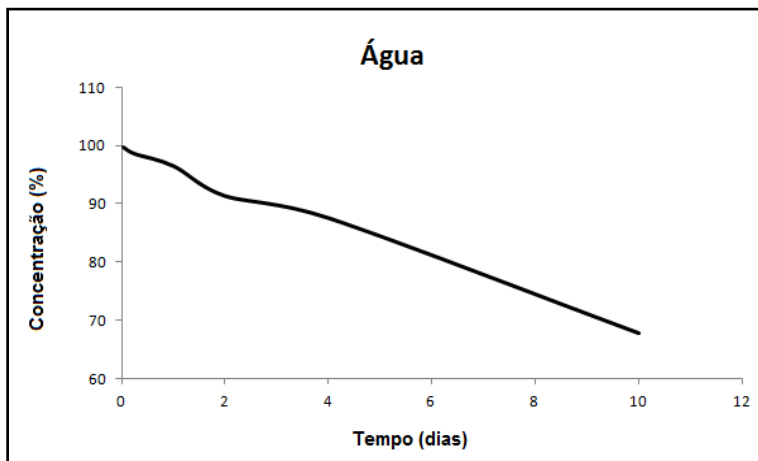


Figura 25 - Gráfico da concentração de FLV em água *versus* tempo em dias.

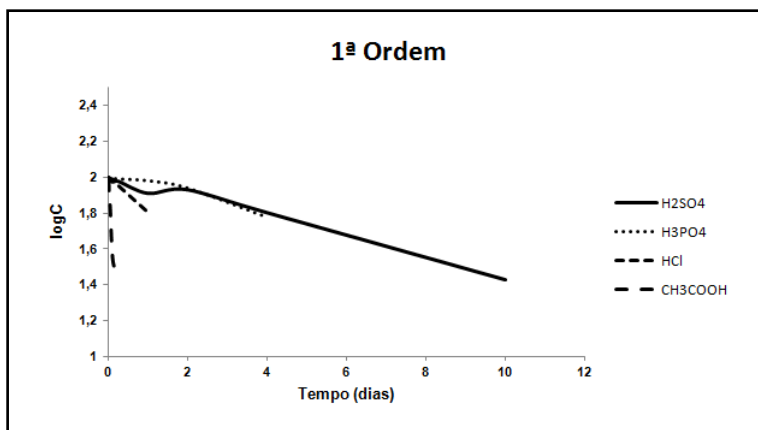


Figura 26 - Gráfico de LogC de FLV em condições ácidas *versus* tempo em dias.

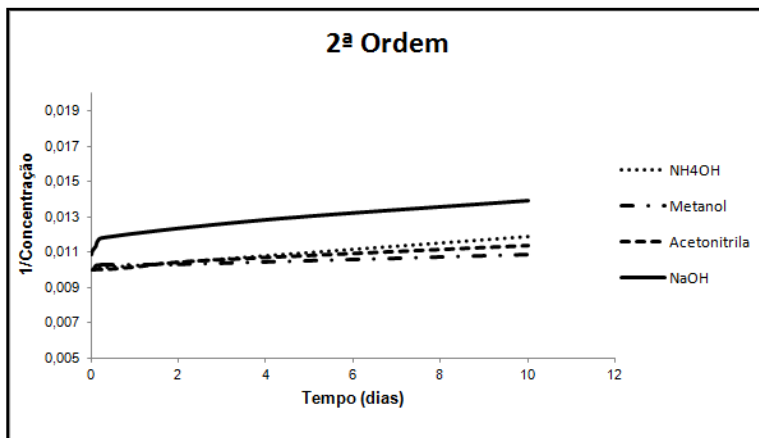


Figura 27 - Gráfico da fração 1/concentração de FLV em condições básicas e solventes orgânicos *versus* tempo em dias.

A análise das amostras por CCD permite verificar que, conforme as reações de degradação prosseguem, ocorre uma diminuição da banda referente à FLV e o aparecimento de bandas relativas aos produtos de degradação. Além disso, evidencia-se que os produtos de degradação também se decompõem quanto mais drástica a condição (Figura 28).

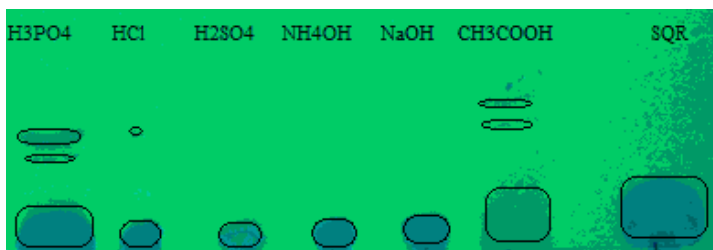


Figura 28 - Cromatoplaça em luz ultravioleta apresentando a banda característica da SQR de Fluvastatina e as amostras do fármaco após mantidas em diferentes diluentes, a 60 °C (fase fixa: sílica-gel; fase móvel: diclorometano:metanol (95:5 v/v); visualização em UV/254 nm).

### 9.1.3 Influência da temperatura

A partir dos resultados da análise de teor de FLV foram plotados gráficos que forneceram os valores de coeficiente de correlação linear ( $r$ ) nas temperaturas de 50 °C, 60 °C e 70 °C. Os valores de  $r$  mais próximos de 1 definiram a ordem de reação (Tabela 12).

Quanto aos parâmetros cinéticos  $k$ ,  $t_{50\%}$  e  $t_{90\%}$ , a sua determinação é dependente do resultado de ordem da reação, tendo em vista a diferença das equações cinéticas dependendo daquela informação. Para a constante  $k$  de velocidade de reação, o seu resultado final é oriundo de uma média das constantes de velocidade específicas para o decaimento de concentração de FLV em cada tempo de coleta. A partir do valor de  $k$ , a aplicação das equações devidas permite a obtenção dos valores de  $t_{50\%}$  e  $t_{90\%}$ .

Os resultados da análise de teor de FLV, obtidos por CLAE, também permitiram definir a ordem das reações de degradação do fármaco em diferentes temperaturas. Os resultados obtidos possibilitaram a construção do gráfico representado pela Figura 29 de acordo com a cinética de segunda ordem observada. Pelo método de Arrhenius plotou-se gráfico representado pela Figura 30, possibilitando o cálculo da constante de velocidade  $k$  a 25 °C ( $k_{25}$ ) e da energia de ativação ( $E_a$ ) (Tabela 12).

Percebe-se que o incremento da temperatura promoveu um aumento linear da velocidade de degradação da FLV decorrente da elevação da energia cinética média das moléculas reagentes. Assim, aumentou a probabilidade de colisões efetivas ocorrerem entre fármaco e solvente, no sentido de aumentar a concentração dos produtos de degradação.

Tabela 12 - Coeficientes de correlação (r) e demais dados obtidos, sendo destacada a ordem da reação para as respectivas temperaturas.

Condição (°C)	r			k (% <sup>-1</sup> )	K <sub>25</sub> (% <sup>-1</sup> )	Ea (cal <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> )
	Zero ordem	1ª ordem	2ª ordem			
50	0,9335	0,9396	0,9451	2,00 x 10 <sup>-9</sup>	6,00 x 10 <sup>-9</sup>	4,58 x 10 <sup>-6</sup>
60	0,9227	0,9407	0,9560	2,06 x 10 <sup>-9</sup>		
70	0,9525	0,9652	0,9759	2,23 x 10 <sup>-9</sup>		

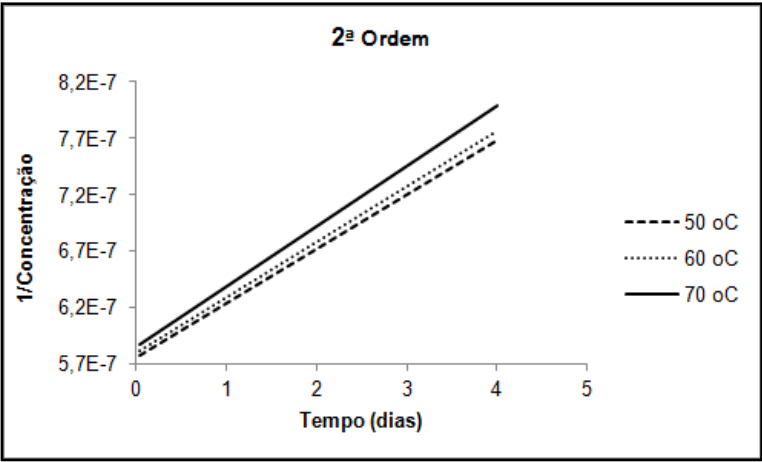


Figura 29 - Gráfico da fração de 1/concentração de FLV em água em diferentes temperaturas *versus* tempo em dias.



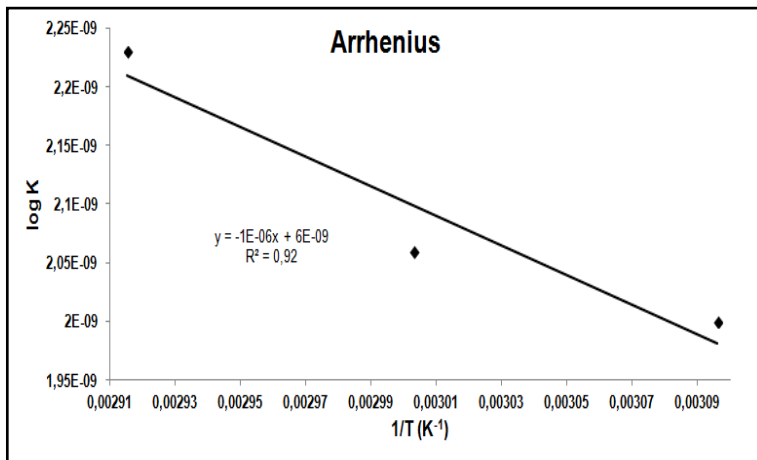


Figura 30 - Gráfico de Arrhenius.

#### 9.1.4 Influência da luz Ultravioleta (UV)

A influência da luz UV foi avaliada por CLAE (GOMES, 2005). As soluções de FLV submetidas à luz UV pelo período de até 6 dias levaram à formação de diversos produtos de degradação, com tempos de retenção diferentes, bem como foi observado decaimento considerável da concentração do fármaco. Os gráficos foram plotados com dados do decaimento da concentração de FLV até que fosse observado platô na concentração final quantificada. Em geral, a irradiação em comprimento de onda de 365 nm promoveu reações de degradação mais rápidas na primeira hora de exposição, conforme exposto na Figura 31, enquanto que em 254 nm os processos degradativos foram mais drásticos após maior tempo de exposição (Figura 32). Esta característica foi observada nos três sistemas avaliados: metanol, acetonitrila e água.

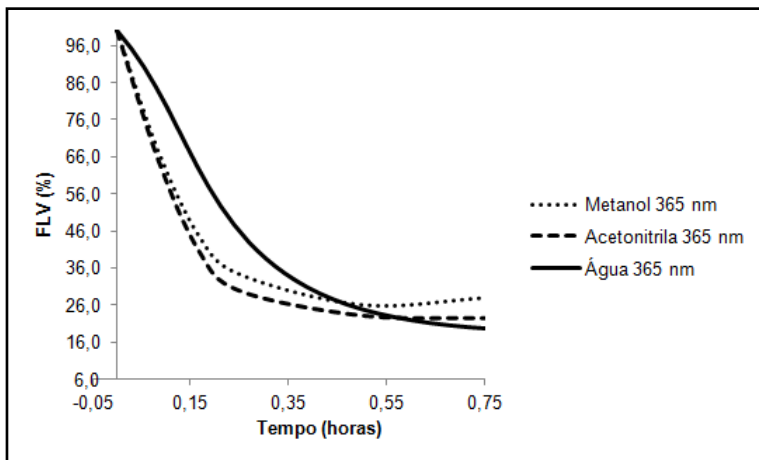


Figura 31 - Gráfico do teor de fluvastatina versus tempo em diferentes solventes expostos à luz ultravioleta 365 nm.

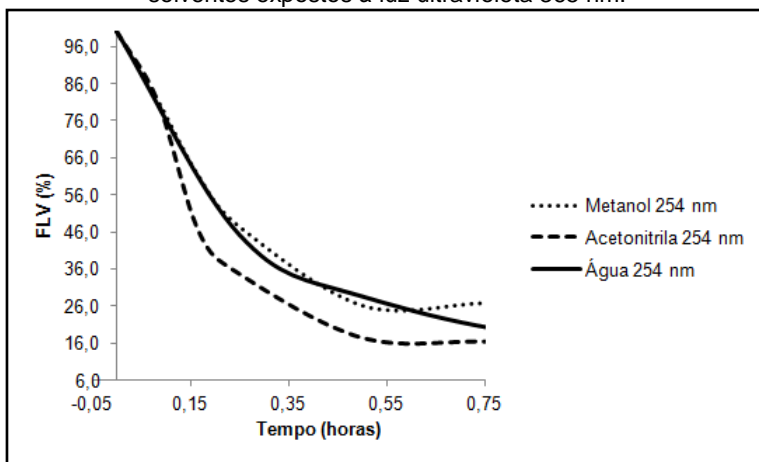


Figura 32 - Gráfico do teor de fluvastatina versus tempo em diferentes solventes expostos à luz ultravioleta 254 nm.

Os cromatogramas do decaimento da concentração de FLV em metanol, acetonitrila e água, expostos à luz ultravioleta 254 nm e 365 nm, podem ser observado nas figuras 33, 35 e 37, respectivamente.

Em metanol, as soluções expostas à luz UV apresentaram a formação de dois produtos majoritários

(codificados como PD 1 – com tempo de retenção de 2,5 minutos; e PD 3, com tempo de retenção de 7,0 minutos) e um produto (PD 2 – 4,5 minutos). Da mesma maneira como se verificaram para as soluções aquosas, os produtos de degradação formados em solução metanólica são decompostos conforme maior é a exposição à luz UV. Em contrapartida, verifica-se, principalmente no caso da lâmpada de 254 nm, um aumento no pico relativo à FLV. Embora sutil este fenômeno provavelmente ocorre devido à reversibilidade da reação de degradação fotolítica da FLV em metanol ou, até mesmo, devido a rearranjos sucessivos que culminam com a regeneração do fármaco. O decaimento do teor da solução metanólica de FLV e a formação dos produtos de degradação após exposição à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365nm estão representados pela figura 33.

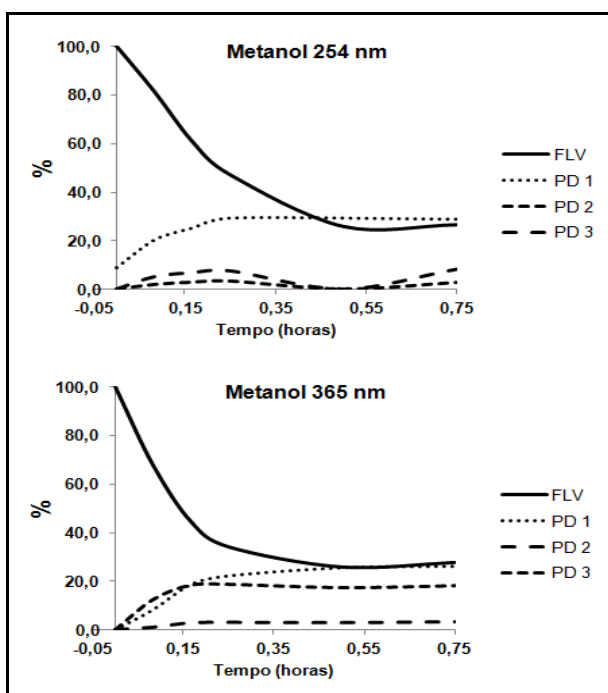


Figura 33 - Gráfico do teor de FLV e seus produtos majoritários *versus* tempo (horas) após fotólise em solução metanólica.

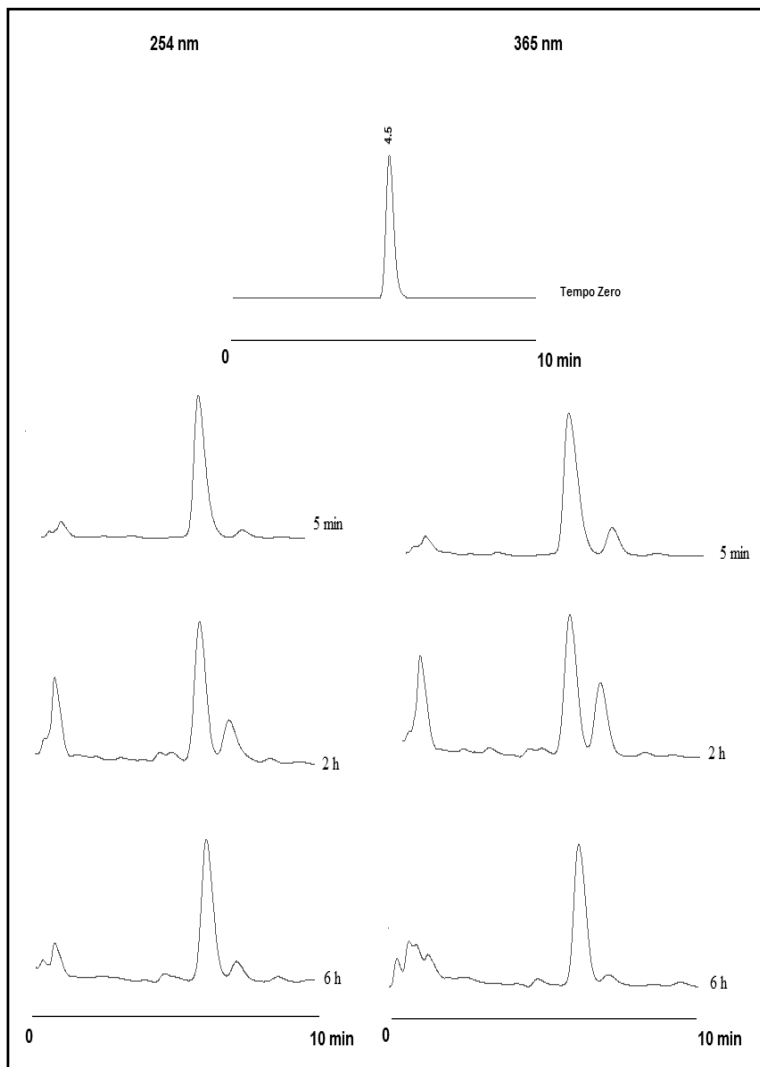


Figura 34 - Cromatogramas utilizados como representação do decaimento da concentração de fluvastatina em soluções metanólicas expostas à luz ultravioleta 254 nm (esquerda) e 365 nm (direita) de acordo com o tempo de exposição.

Da mesma maneira, em acetonitrila, as soluções expostas à luz UV apresentaram a formação de dois produtos

(PD 1 e PD 3) majoritários e um produto detectável (PD 2). Destaca-se a formação predominante de PD 1 e a rápida degradação da FLV nestas condições. Além disso, as soluções em acetonitrila apresentam algumas particularidades frente às outras análises. Ressalta-se a manutenção das concentrações de FLV em solução após 1 hora e 30 minutos de exposição (figura 36).

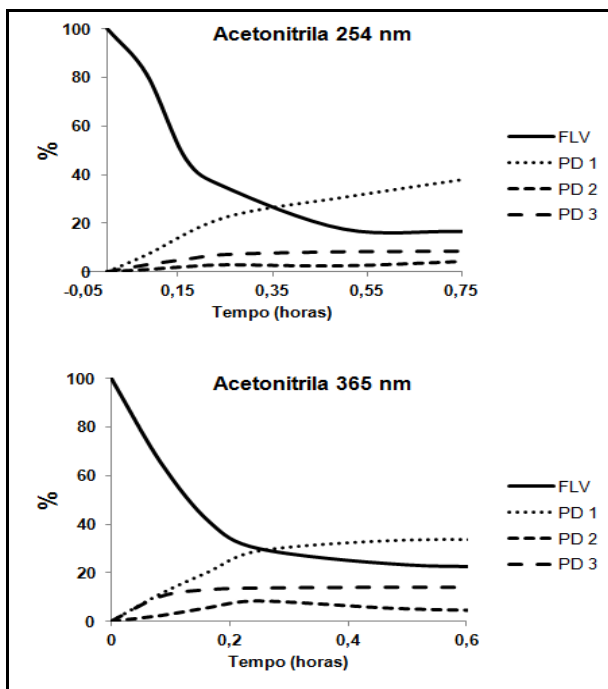


Figura 35 - Gráfico do teor de FLV e seus produtos majoritários *versus* tempo (horas), após fotólise em acetonitrila.

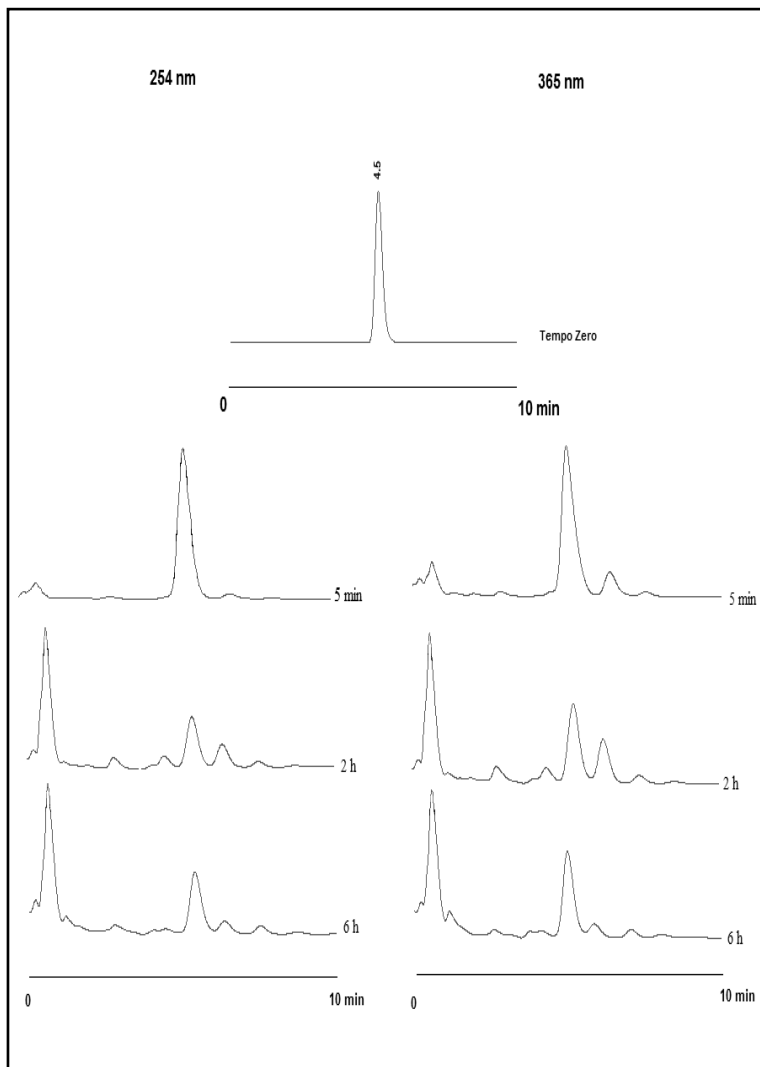


Figura 36 - Cromatogramas utilizados como representação do decaimento da concentração de fluvastatina em acetonitrila exposta à luz ultravioleta 254 nm (esquerda) e 365 nm (direita) de acordo com o tempo de exposição.

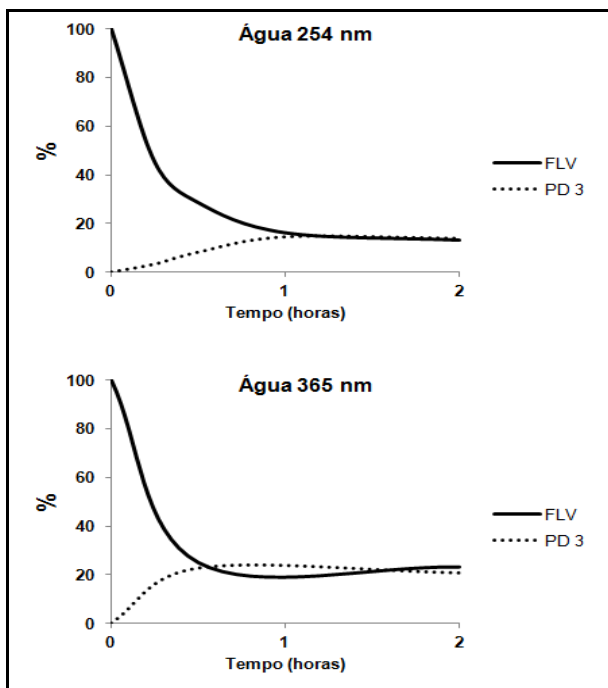


Figura 37 - Gráfico do teor de FLV e seu produto majoritário *versus* tempo (horas), após fotólise em solução aquosa.

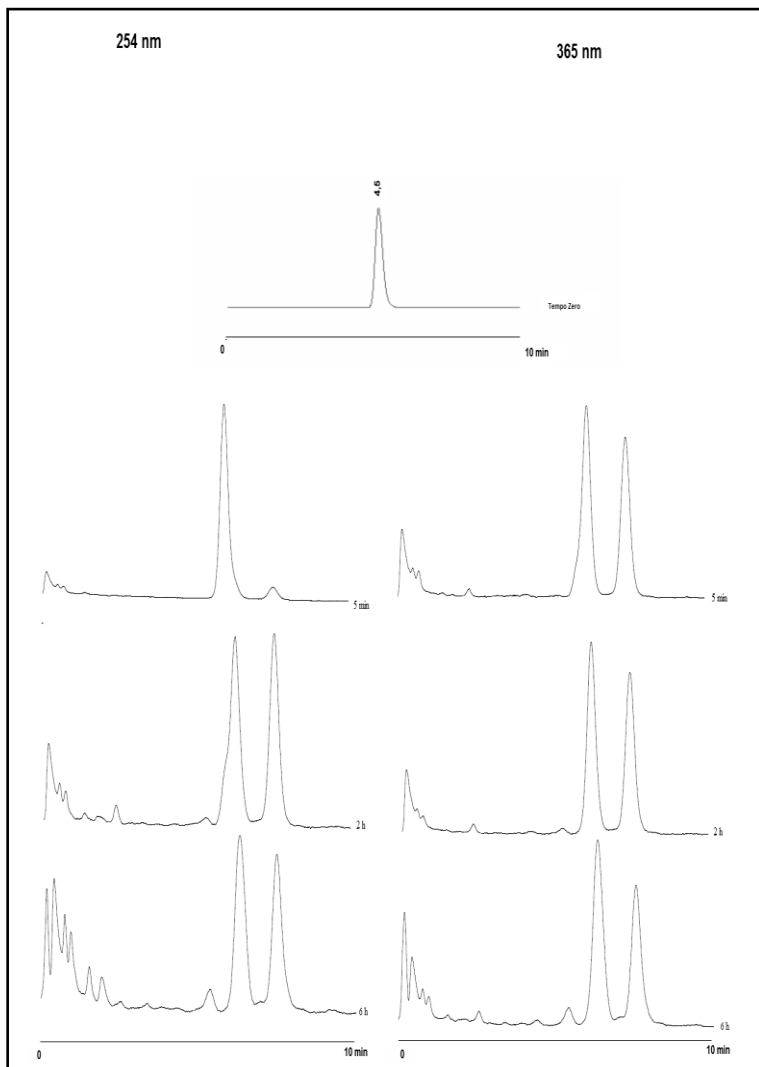


Figura 38 - Cromatogramas utilizados como representação do decaimento da concentração de fluvastatina em soluções aquosas expostas à luz ultravioleta 254 nm (esquerda) e 365 nm (direita) de acordo com o tempo de exposição.

Assim como foi observado nos estudos de estabilidade da FLV em solução frente diferentes diluentes, a água



demonstrou-se o solvente mais crítico no que se refere à decomposição fotolítica. Neste caso, foi detectado um produto majoritário (codificado como PD 3) com tempo de retenção de 7,0 minutos, além de outros produtos de degradação. Acredita-se que o PD 3 em solução aquosa, por sua vez, também sofra processos de degradação e se decomponha conforme aumente o tempo de exposição a luz (figura 38). Entretanto, o método utilizado não permitiu separar os produtos adicionais que apareceram em baixos tempos de retenção.

Verificou-se, ainda, a cinética das reações de degradação fotolítica do fármaco. De acordo com a tabela 13, todos os sistemas seguem a cinética de segunda ordem.

Tabela 13 - Coeficientes de correlação (r) e demais dados obtidos, sendo destacada a ordem da reação para os respectivos sistemas.

Condição	$\lambda$ (nm)	R		
		Zero ordem	Primeira ordem	Segunda ordem
Metanol	254	0,9319	0,9921	0,9953
	365	0,7606	0,8643	0,9450
Acetonitrila	254	0,6894	0,8656	0,9570
	365	0,7197	0,8309	0,9220
Água	254	0,2354	0,7013	0,9918
	365	0,3109	0,8002	0,9821

## 9.2 ESTUDOS DE ESTABILIDADE NO ESTADO SÓLIDO

Os inibidores da HMG-CoA redutase são suscetíveis à degradação em solução, em pH abaixo de 8, particularmente em condições ácidas, com interconversão entre a sua forma ativa (hidroxiácido) e a sua forma inativa (lactona) (TORESO; ERIKSSON, 1996). Para a FLV o mecanismo desta interconversão, tanto em meio básico como ácido, foi investigado teoricamente por Grabarkiewicz e colaboradores (2006), utilizando o método da Teoria do Funcional da Densidade. Os autores verificaram que em meio ácido o sistema existe em equilíbrio, enquanto em meio básico ocorre deslocamento do

equilíbrio para a formação do hidróxiácido biologicamente ativo (GRABARKIEWICZ et al., 2006). Algumas estratégias têm sido propostas para prevenir a degradação da FLV em formulações, tais como preparar dispersões sólidas do fármaco com diferentes polímeros (TORESO, ERIKSSON, 1996) intercalar o fármaco em hidróxido de dupla camada, através do método de coprecipitação (PANDA, DRIVASTANA, BAHADUR, 2009) ou pela adição de bicarbonato de sódio como excipiente em formas de liberação oral (KABADI, VIVILECCHIA, 1994).

Alguns estudos tem demonstrado a instabilidade da FLV frente à luz. Mielcarek e colaboradores (2005) realizaram estudos do fármaco em soluções aquosa e metanólica expostas à luz UV com emissão em 365 nm (MIELCAREK et al., 2005). Nestas condições, a degradação da FLV seguiu a cinética de pseudo-primeira ordem. Em 2009 os mesmos autores realizaram a identificação e elucidação estrutural de três fotoprodutos por cromatografia de alta eficiência em camada delgada (MIELCAREK, NASHRENT, GROBELNY, 2009). Com o objetivo de avaliar o risco associado à liberação de fármacos de alto consumo no ambiente aquático, considerados como poluentes emergentes, Cermola e colaboradores (2007) realizaram estudo de elucidação estrutural dos principais produtos de degradação formados durante o processo de transformação fotoquímica da FLV em meio aquoso, após exposição à luz solar e UV, acima de 300 nm. A fotociclização e a fotooxigenação foram as principais reações envolvidas na formação dos produtos observados (CERMOLA et al., 2007).

Recentemente um estudo avaliou a citotoxicidade de FLV e de seu principal produto de degradação após exposição à luz UV-A de soluções aquosas contendo o fármaco (VIOLA et al., 2010). Os autores verificaram que a FLV é dotada de potencial fototoxicidade *in vitro* em linhagem celular humana de queratinócitos e também em fibroblastos, que pode ser mediada pela formação de produto com alto potencial fotosensibilizante. A forma sólida de uma substância farmacêutica influencia grandemente as suas propriedades e o seu desempenho, tais como estabilidade e biodisponibilidade. Considerando que os fármacos são comumente disponibilizados em formas farmacêuticas sólidas, um aspecto fundamental para o seu desenvolvimento é compreender a química do estado sólido do composto (ENMAN et al., 2011). Embora existam muitos estudos

referentes à degradação de fármacos em solução, relativamente poucos estudos têm sido realizados no estado sólido (GLASS, NOVAK, BROWN, 2004). Considerando que cada estado cristalino possui um nível de energia diferente e uma diferente reatividade química, estudos desta natureza são relevantes.

### **9.2.1 Análise das amostras por CLAE**

As análises foram realizadas de acordo com as condições já descritas no item 8.2.1.

As análises por CLAE foram realizadas para monitorar a alteração na concentração da FLV em função do tempo de exposição e o aparecimento de picos adicionais. Conforme se verifica na Tabela 14, houve diminuição significativa da concentração do fármaco com o tempo, com formação de três picos adicionais majoritários (Figura 38) denominados PD1 ( $t_R$  de 1,3 minutos); PD2 ( $t_R$  de 5,1 minutos) e PD3 ( $t_R$  de 5,7 min) os quais tiveram suas concentrações calculadas com relação ao pico principal de FLV.

Tabela 14 - Teor em % das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH, e de seus respectivos produtos de degradação majoritários antes da exposição à luz UV e após os diferentes períodos de exposição.

Tempo de exposição à luz UV (dias)							
Amostra	Zero	1	2	3	5	8	15
<b>FLV-MP</b>	107,9	93,6	91,0	76,7	68,8	54,6	49,8
<b>PD1</b>	0	0	0	0	0	1,6	2,3
<b>PD2</b>	0	3,5	3,2	10,2	8,5	11,6	2,1
<b>PD3</b>	0	0	0	3,1	2,3	2,7	0,8
<b>FLV-ACN</b>	102,1	89,3	84,2	80,7	74,4	61,8	52,1
<b>PD1</b>	0	0	0	0	0	0,8	1,8
<b>PD2</b>	0	2,7	2,9	4,5	5,3	1,5	2,3
<b>PD3</b>	0	0	0	1,9	1,0	1,3	1,3
<b>FLV-EOH</b>	99,6	81,1	72,9	69,4	63,8	51,4	44,4
<b>PD1</b>	0	0	0	0	0	2,0	0,9
<b>PD2</b>	0	5,8	6,9	9,5	10,9	19,2	23,7
<b>PD3</b>	0	2,5	3,3	5,3	7,0	15,9	20,5

Para todas as amostras o produto PD1 foi detectado a partir do oitavo dia, enquanto PD2 apareceu a partir de 24 horas de exposição à luz. O PD3 apareceu a partir do terceiro dia para FLV-MP e FLV-ACN, mas para FLV-EOH observa-se este produto em 24 horas. Em relação ao teor, verifica-se que houve maior formação de PD2 (23,7%) e PD3 (20,5%) para a amostra FLV-EOH em comparação com as demais amostras, onde a quantidade de produtos formados não foi superior a 3% (Tabela 14). A representação gráfica do decaimento do teor das amostras após exposição à luz UV e a formação de seus produtos majoritários *versus* tempo (dias) estão apresentados na Figura 40.

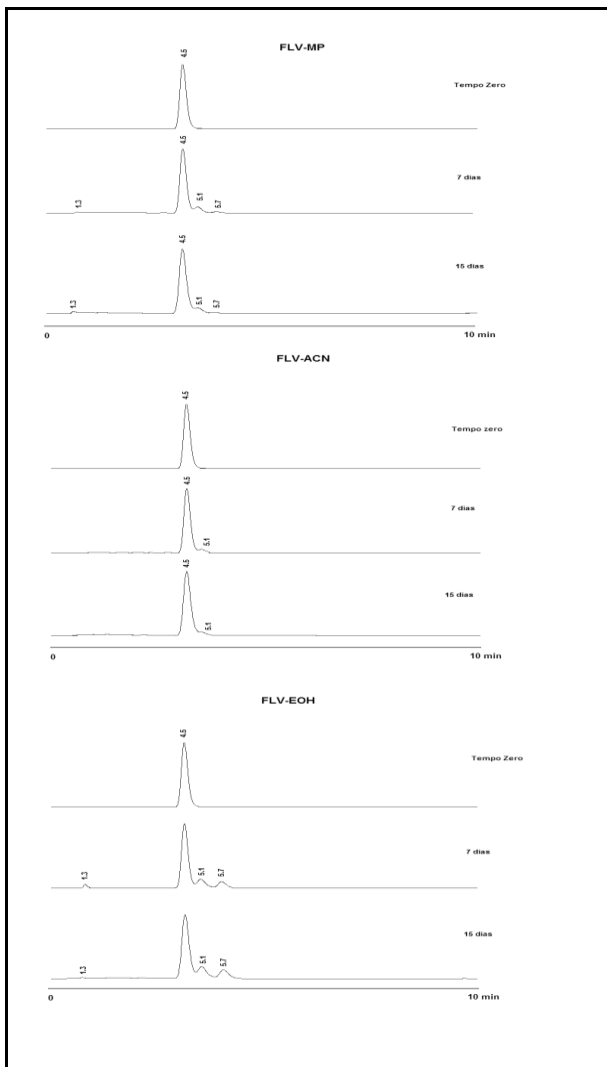


Figura 39 - Cromatogramas das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH e seus produtos de degradação majoritários, antes e após a exposição à luz UV (365 nm), nos tempos zero, 7 e 15 dias.

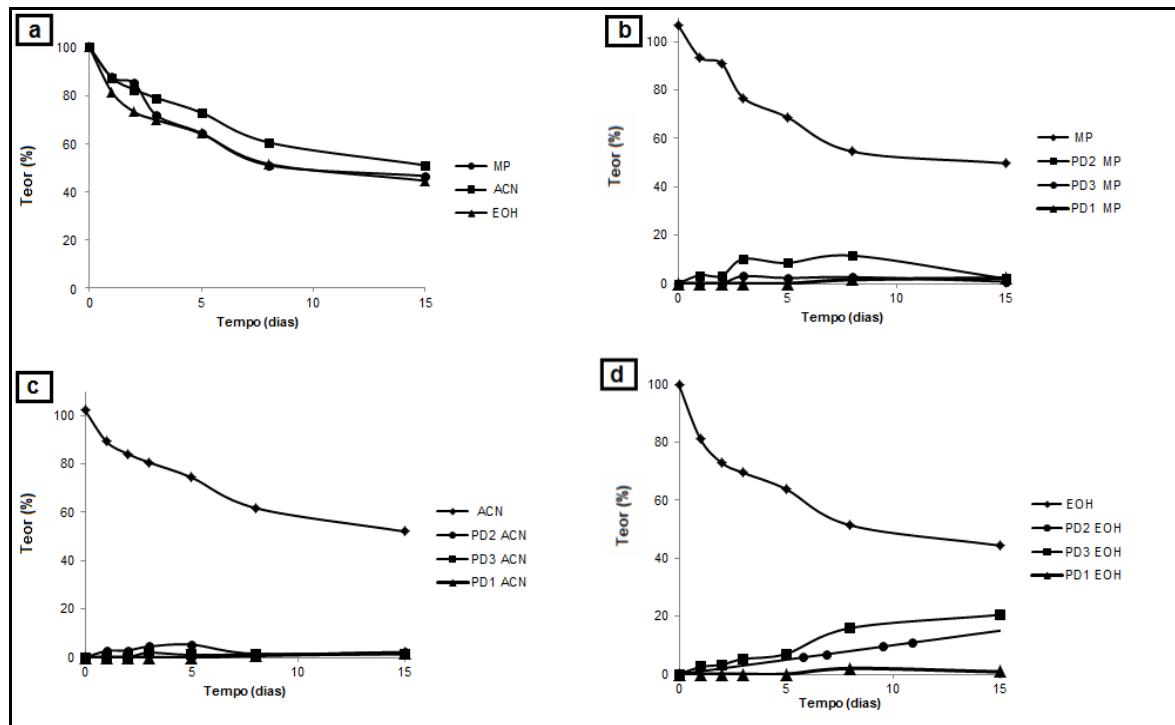


Figura 40 - Representação gráfica do decaimento do teor das amostras (a: FLV-MP, FLV-ACN e FLV-ETOH) e das amostras e seus produtos majoritários (b: FLV-MP; c: FLV-ACN e d: FLV-EOH) em função do tempo.

As diferenças de degradação entre as amostras poderiam estar relacionada à estrutura cristalina das mesmas. As análises de difração de raios x de pó (DRX) realizadas com as amostras após 15 dias na luz indicaram que não houve diferença significativa em seus padrões de DRX, como pode ser observado na figura 41. Estudo das propriedades no estado sólido de FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH, realizado por Borgmann e colaboradores (2012), mostrou que FLV-MP e FLV-ACN, identificadas como forma I, são monohidratos, com 4% de teor de água, diferentes morfologias, boa cristalinidade e com uma única molécula na unidade assimétrica (BORGSMANN et al., 2012). Já a FLV-EOH constitui-se em uma mistura de formas sólidas (Forma I e outra com alto grau de desordem do cristal); é um solvato e apresentou teor de água superior a 16%. Os estudos em fotoestabilidade da FLV em solução indicaram que a degradação é maior em água que em outros solventes. Desta forma, o alto teor de água de FLV-EOH pode estar contribuindo para a maior instabilidade desta amostra.

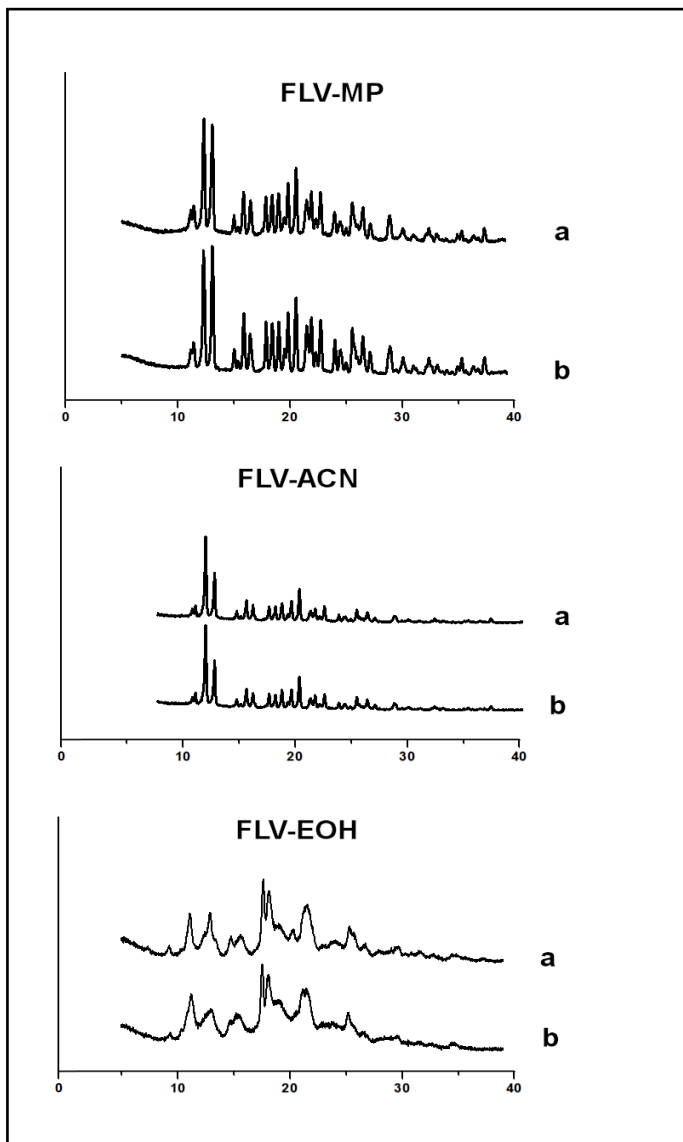


Figura 41 - Padrões de DRX das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH antes (a) e após 15 dias de exposição à luz UV (b).



Os dados cinéticos do processo de fotodegradação das amostras, apresentados na Tabela 15, indicam que a degradação seguiu cinética de segunda ordem (> valor de r) para todas as amostras.

Tabela 15 - Coeficientes de correlação (r) e dados cinéticos, sendo destacada a ordem da reação para cada amostra avaliada.

Amostra	r			k (% <sup>-1</sup> )	t <sub>50%</sub> (dias)	t <sub>90%</sub> (dias)
	Zero ordem	1ª ordem	2ª ordem			
FLV-MP	0,9596	0,9779	0,9830	$7,45 \times 10^{-4}$	12,5	1,3
FLV-ACN	0,9464	0,9693	0,9840	$6,0 \times 10^{-4}$	16,3	1,8
FLV-EOH	0,9007	0,9372	0,9628	$8,0 \times 10^{-4}$	12,6	1,4

A representação gráfica desta cinética está apresentada na Figura 42. Correlações entre o comportamento fotoquímico em solução e no estado sólido nem sempre são claramente estabelecidos. Entretanto, estudo realizado previamente com soluções de FLV em água e metanol, submetidas à luz com emissão em 254 e em 365 nm, seguiram a mesma cinética encontrada no estado sólido, ao contrário do estudo realizado por Mielcarek e colaboradores (2005), em que a cinética em solução aquosa ou metanólica foi de pseudo-primeira ordem, em um tempo de 10 minutos (MIELCAREK et al., 2005). Acredita-se que as diferenças sejam decorrentes dos diferentes tempos de exposição das amostras à luz (15 dias no presente estudo e 10 minutos no estudo de Mielcarek). Quando o tempo de reação não é suficientemente longo, a decomposição pode ser menor, e a escolha correta da ordem da reação pode ser prejudicada (NETZ, ORTEGA, 2002).

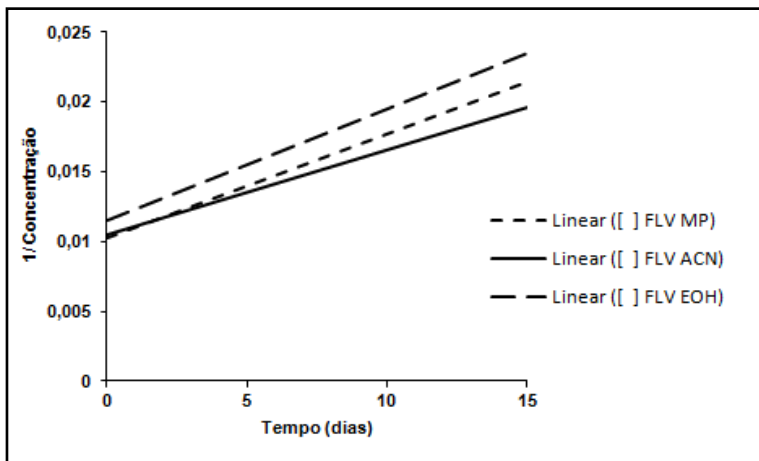


Figura 42 - Representação gráfica da cinética de segunda ordem ( $1/C$ ) das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH.

### 9.3 CITOTOXICIDADE

Dentre as etapas para registro e comercialização de fármacos e medicamentos, a avaliação toxicológica é considerada como uma etapa obrigatória que deve seguir recomendações específicas de órgãos reguladores. Para detectar a toxicidade das amostras a serem testadas realizam-se ensaios *in vitro* e *in vivo*, clínicos e não clínicos, com capacidade de realizar a identificação de possíveis riscos relevantes em humanos (ICH, 1995; SNYDER, GREEN, 2001; SNYDER, EWING, HENDRY, 2006).

As possíveis impurezas presentes junto ao fármaco ou à preparação farmacêutica podem ser responsáveis pelos riscos de toxicidade. O ICH contempla a avaliação dessas impurezas, descrevendo a necessidade de realizar estudos direcionados à identificação e determinação da segurança dos fármacos e medicamentos que às contêm (ICH, 2006a; ICH, 2006b).

As impurezas podem ser oriundas da síntese química dos fármacos ou produzidas a partir da reação deste com excipientes ou materiais de embalagem da forma farmacêutica. Quando as impurezas são resultantes dessas reações elas podem ser definidas como produtos de degradação. Também devem ser avaliados com relação aos parâmetros de

identificação e segurança citados os produtos detectados em estudos de estabilidade de um novo produto efetuados nas condições de armazenamento recomendadas (ICH, 2006a; ICH, 2006b).

A caracterização estrutural e a avaliação da segurança biológica dos produtos de degradação dos medicamentos dependem de suas quantidades relativas presentes na formulação, ou seja, recomenda-se a realização desses ensaios quando as impurezas estiverem presentes em um limite mínimo com relação à dose diária indicada para a forma farmacêutica (ICH, 2006a; ICH, 2006b).

A dose máxima diária recomendada para FLV é de 80mg. De acordo com o ICH (1996) se a dose diária máxima não ultrapassar 2g a identificação do produto de degradação, ou impureza, deve ser realizada quando o mesmo estiver presente em concentrações mínimas de 0,1%. Já, para a avaliação da segurança biológica, através de testes de toxicidade, a concentração mínima deve ser de 0,15%.

Com o objetivo de avaliar uma possível toxicidade das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH com e sem a presença de seus respectivos produtos de degradação realizou-se estudo de citotoxicidade em fibroblastos saudáveis de gengiva humana. O estudo foi realizado utilizando-se o ensaio colorimétrico do MTT e para cada amostra calcularam-se os valores de  $CC_{50}$ , após 48h de incubação como pode ser observado na tabela 16.

O sal de tetrazólio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias através das desidrogenases. O MTT é convertido ao composto formazana ao ser reduzido. O formazana, que fica armazenado no citoplasma, possui uma coloração azul-escuro e é insolúvel em água (MOSMANN, 1983).

Por ser considerado um método sensível e quantitativo, o método colorimétrico com MTT é utilizado para quantificar a produção de formazana. Através da espectrofotometria é possível realizar a quantificação de formazana a que o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

A avaliação toxicológica dos produtos de degradação formados durante o estudo de estabilidade é relevante para

identificar os possíveis riscos relevantes para uso em humanos (ICH, 2006a; ICH, 2006b).

Considerando que as quantidades formadas dos produtos ficaram acima deste limite no estudo de fotodegradação realizado, realizou-se estudo de citotoxicidade em fibroblastos saudáveis de gengiva humana, com o objetivo de avaliar uma possível toxicidade das amostras, com e sem a presença de seus respectivos produtos de degradação. O estudo foi realizado utilizando o ensaio colorimétrico do MTT, por ser considerado um método sensível e quantitativo. Os valores de  $CC_{50}$  de cada amostra, calculados após 48h de incubação, encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores de  $CC_{50}$  das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH calculados após teste de viabilidade celular

Amostra	CC50 ( $\mu$ M)		
	Tempo Zero	7 dias	15 dias
FLV-MP	466,3 $\pm$ 33,7	276,4 $\pm$ 12,0	258,8 $\pm$ 12,3
FLV-ACN	> 500	234,1 $\pm$ 30,4	171,4 $\pm$ 8,0
FLV-EOH	>500	177,6 $\pm$ 13,5	172,4 $\pm$ 14,20

Antes do processo de fotodegradação a FLV-MP apresentou uma toxicidade ligeiramente superior às demais amostras. Entretanto, após os períodos de exposição à luz UV as amostras FLV-ACN e FLV-EOH apresentaram maior toxicidade frente aos fibroblastos do que a observada para FLV-MP. Após 15 dias de exposição à luz verifica-se que FLV-ACN apresentou toxicidade semelhante à apresentada por FLV-EOH, e ambas apresentaram maior toxicidade que FLV-MP. Comparando os resultados da citotoxicidade com a formação de produtos de degradação, verifica-se que FLV-ACN, embora tenha formado apenas em torno de 3% de produto de degradação, apresentou citotoxicidade similar a FLV-EOH, que apresentou em torno de 45% de produtos de degradação. Isto sugere que algum dos produtos formados é bastante tóxico, uma vez que pequenas concentrações já demonstraram citotoxicidade considerável. Sugere-se que este produto seja o mesmo isolado por Viola e

colaboradores (2010), que apresentou citotoxicidade relevante, e foi caracterizado como um composto com estrutura tipo benzocarbazol (VIOLA et al., 2010).

## **10 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS: ESTABILIDADE**

O teste de estabilidade é um procedimento de rotina realizado em fármacos e produtos farmacêuticos, e é empregado em diferentes fases de desenvolvimento farmacêutico. A estabilidade está relacionada não somente à estabilidade química intrínseca da molécula, mas também à forma física, processo de fabricação, interações entre os componentes da formulação, recipiente e sistemas de fechamento e condições de armazenamento (como temperatura, luz e umidade). Devido as suas propriedades físico-químicas intrínsecas e fácil manuseio, o estado sólido é ainda o estado físico dominante dos fármacos, os quais podem existir em diferentes formas químicas e físicas, como sais, co-cristais, polimorfos, formas anidras ou hidratadas, formas quirais, entre outras (GUO, 2009).

Nas duas últimas décadas tem havido um aumento significativo na compreensão mecanicista das características de estado sólido de fármacos. Muitos estudos têm relacionado o comportamento térmico de fármacos no estado sólido, mas a maior parte da informação disponível sobre fotodegradação refere-se a reações em soluções (usualmente aquosa) (GLASS, NOVAK, BROWN, 2004). Poucos estudos têm avaliado o comportamento fotoquímico das estatinas, especialmente a FLV, principalmente no estado sólido (MIELCAREK et al., 2005; MEILCAREK, NASHRENT, GROBELNY, 2009; CERMOLA et al., 2007; VIOLA et al., 2010). Neste estudo avaliou-se o comportamento frente à luz de uma matéria-prima obtida comercialmente e duas amostras cristalizadas em solventes amplamente utilizados em estágios finais de cristalização e como co-solventes.

As análises por CLAE foram realizadas para monitorar a alteração na concentração da FLV em função do tempo de exposição e o aparecimento de picos adicionais. A análise dos resultados permite observar que houve diminuição significativa da concentração do fármaco com o tempo, com formação de três picos adicionais majoritários. Conforme pode ser observado nos resultados, as diferentes formas cristalinas apresentaram

diferentes comportamentos com relação aos processos degradativos. As diferenças de degradação entre as amostras poderiam estar relacionadas à estrutura cristalina das mesmas. As análises de DRX realizadas com as amostras após 15 dias de exposição à luz UV, indicaram que não houve diferença significativa em seus padrões de DRX.

O estudo das propriedades no estado sólido das amostras FLV-MP, FLV-ACN e FLV-EOH mostrou que, FLV-MP e FLV-ACN, identificadas como forma I, são monohidratos; com 4% de teor de água; de diferentes morfologias; boa cristalinidade e com uma única molécula na unidade assimétrica. Já a FLV-EOH constitui-se em uma mistura de formas sólidas (Forma I e uma outra forma com alto grau de desordem do cristal); é um solvato e apresentou teor de água superior a 16%.

Estudos de fotoestabilidade da FLV em solução indicaram que a degradação é maior em água que em outros solventes. Desta forma, o alto teor de água de FLV-EOH pode estar contribuindo para a maior instabilidade desta amostra.

Os dados cinéticos do processo de fotodegradação das amostras indicam que a degradação seguiu cinética de segunda ordem ( $>$  valor de  $r$ ) para todas as amostras. Correlações entre o comportamento fotoquímico em solução e no estado sólido nem sempre são claramente estabelecidos. Entretanto, os estudos realizados com soluções de FLV em água, metanol e acetonitrila, submetidas à luz com emissão em 254 e em 365 nm, seguiram a mesma cinética encontrada no estado sólido, ao contrário do estudo realizado por Mielcarek e colaboradores (2005), em que a cinética em solução aquosa ou metanólica foi de pseudo-primeira ordem, em um tempo de 10 minutos (MIELCAREK et al., 2005). Acredita-se que as diferenças sejam decorrentes dos diferentes tempos de exposição das amostras à luz (15 dias no presente estudo e 10 minutos no estudo de Mielcarek). Quando o tempo de reação não é suficientemente longo, a decomposição pode ser menor, e a escolha correta da ordem da reação pode ser prejudicada (NETZ, ORTEGA, 2002).

A avaliação toxicológica dos produtos de degradação formados durante um estudo de estabilidade é relevante para identificar os possíveis riscos relevantes para uso em humanos (ICH, 2006a; ICH, 2006b). A avaliação da segurança biológica dos produtos de degradação dos medicamentos depende de suas quantidades relativas presentes na formulação, sendo

recomenda a realização desses ensaios quando estas quantidades estiverem presentes em um limite mínimo com relação à dose diária indicada para a forma farmacêutica (ICH, 2006a; ICH, 2006b).

A dose máxima diária recomendada para FLV é de 80 mg. De acordo com o ICH (1996), a avaliação da segurança biológica através de testes de toxicidade deve ser realizada quando a concentração mínima dos produtos de degradação for de 0,15% (ICH, 2006). Considerando que as quantidades dos produtos de degradação formadas durante o estudo realizado ficaram acima deste limite, surgiu a necessidade realizar a avaliação da citotoxicidade das amostras submetidas à fotodegradação. Realizou-se, então, estudo de citotoxicidade em fibroblastos saudáveis de gengiva humana, com o objetivo de avaliar uma possível toxicidade das amostras, o qual foi conduzido com e sem a presença de seus respectivos produtos de degradação. O estudo foi realizado utilizando o ensaio colorimétrico do MTT, por ser considerado um método sensível e quantitativo. O MTT é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular mais utilizado, sendo capaz de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

Antes do processo de fotodegradação a FLV-MP apresentou toxicidade ligeiramente superior às demais amostras. Entretanto, após os períodos de exposição à luz UV as amostras FLV-ACN e FLV-EOH apresentaram maior toxicidade frente aos fibroblastos do que a observada para FLV-MP. Após 15 dias de exposição à luz verifica-se que FLV-ACN apresentou toxicidade semelhante à apresentada por FLV-EOH, e ambas apresentaram maior toxicidade que FLV-MP. Comparando os resultados da citotoxicidade com a formação de produtos de degradação, verifica-se que FLV-ACN, embora tenha formado apenas em torno de 3% de produto de degradação, apresentou citotoxicidade similar a FLV-EOH, que apresentou em torno de 45% de produtos de degradação. Isto sugere que algum dos produtos formados é bastante tóxico, uma vez que pequenas concentrações já demonstraram citotoxicidade considerável. Sugere-se que este produto seja o mesmo isolado por Viola e colaboradores (2010), que apresentou citotoxicidade relevante, e

foi caracterizado como um composto com estrutura tipo benzocarbazol (VIOLA, et al., 2010).



**CONCLUSÃO**

---



## 11 CONCLUSÃO

- ✓ Duas formas cristalinas de fluvastatina foram preparadas por recristalização em acetonitrila (FLV-ACN) e em etanol (FLV-EOH) e foram comparadas com a matéria-prima (FLV-MP) e com o padrão (FLV-USP) do fármaco, por diferentes técnicas de caracterização;
- ✓ FLV-MP, FLV-USP e FLV-ACN são hidratos de diferentes formas cristalinas, enquanto FLV-EOH é um solvato com mistura de fases;
- ✓ FLV-MP e FLV-ACN foram identificadas como Forma I, possuindo boa cristalinidade, uma única molécula de Fluvastatina Sódica em cela assimétrica, sendo identificadas como monohidrato contendo 4% de conteúdo de água;
- ✓ FLV-USP foi designada como Forma II, é um hidrato, contendo em torno de 9% de conteúdo de água;
- ✓ FLV-EOH, que foi identificada como um solvato, apresentou mistura de fases, sendo uma fase a Forma I e outra fase com alto grau de desordem em sua rede cristalina;
- ✓ FLV-MP e FLV ACN apresentam a mesma estrutura cristalina, porém morfologias e comportamentos de VDI diferentes. FLV-MP apresentou maior razão de dissolução, evidenciando que não apenas o polimorfismo, mas também a morfologia das matérias-primas pode modificar a dissolução intrínseca.
- ✓ As diferentes formas cristalinas analisadas apresentaram diferentes comportamentos frente à temperatura e ao tempo de envelhecimento. Todas as amostras de FLV apresentaram higroscopicidade, e o conteúdo inicial de água e a variação do mesmo durante o período de armazenamento foi dependente da estrutura cristalina da forma sólida de FLV.

- ✓ FLV-USP apresentou modificações significativas em suas propriedades do estado sólido e um aumento surpreendente no conteúdo de água após um ano. A estrutura cristalina de FLV-USP parece apresentar maior afinidade com as moléculas de água que FLV-MP, a qual apresentou ser a forma cristalina mais estável. Após o período de um ano a composição química (incluindo o conteúdo de água) e as propriedades do estado sólido de FLV-MP não apresentaram modificações significativas.
- ✓ O estudo de fotodegradação de amostras de fluvastatina, cristalizadas em acetonitrila ou etanol, mostrou que as formas cristalinas estudadas apresentaram comportamento diferenciado quanto ao % de formação de produto de degradação e citotoxicidade em relação à matéria-prima disponível comercialmente. Verificou-se, também, que as amostras apresentaram citotoxicidade significativa por ação da luz.
- ✓ Os resultados obtidos salientam que estudos desta natureza são relevantes para planejar o desenvolvimento de formas sólidas de dosagem oral em conjunto com análises de controle de qualidade de maior eficácia, já que a presença de diferentes formas cristalinas, que apresentem diferentes características, pode estar disponibilizando medicamentos que não garantam a eficácia e a segurança aos usuários.

## REFERÊNCIAS

---



## 12 REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y.; PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, p.127-144, 2004.

AGUIAR, A.; KRC, J.; KINDEL, A.; SAMYN, J.C. Effect of Polymorphism on the absorption of Chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.56(7), p.847-853, 1967.

AGUIAR, M.R.M.P.; GEMAL, A.L.; GIL, R.A.S.S. Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido. *Química Nova*, v.22(4), p.553-564, 1999.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.; ALLEN, L. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6<sup>a</sup>.ed. São Paulo: Premier, 2000. 397p.

ASTARITA, A.; DELLGRECA, M.; LESCE, M.R.; MONTANARO, S.; PREVITERA, L.; TEMUSSI, F. Polycyclic compounds by sunlight exposure of the drug rosuvastatin in water. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, v.187, p.263-268, 2007.

AUER, M.E.; GRIESSER, U.J.; SAWATZKI, J. Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy. *Journal of molecular structure*, v.661/662, p.307-317, 2003.

AULTON, M.E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. Trad. George G. Ortega, Porto Alegre, Ed. Artmed, 2005.

BAERTSCHI, S.W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. *Trends in analytical Chemistry*, v.25 (8), p.758-767, 2006.

BAI, S.; WANG, W.; DYBOWSKI, C. Solid state NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 82, p.4917-4924, 2010.

BALCHIN, E.; MALCOLME-LAWES, D.J.; POPLETT, I.J.F.; ROWE, M.D.; SMITH, J.A.S.; PEARCE, G.E.S.; WREN, S.A.C. Potential of nuclear quadrupole resonance in pharmaceutical analysis. *Analytical Chemistry*, v.77, p.3925-3930, 2005.

BARBOSA, L.C.A. *Espectroscopia no Infravermelho: na caracterização de Compostos Orgânicos*. Viçosa, Editora UFV, 2007. 189p.

BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. *Pharmaceutical Research*, v.18(6), 859-866, 2001.

BERNSTEIN, J.; DAVEY, R.J.; HENCK, J.O. Concomitant polymorphs. *Angewandte Chemie- International Edition*, v.38(23), p.3440-3461, 1999.

BEVAN, C.; LLOYD, R.S. A high throughput screening methods for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Analytical Chemistry*, v.72, p.1781-1787, 2000.

BLUM, C.B. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase. *The American Journal of Cardiology*, v.73(14), p.3-11, 1994.

BOLDYREVA, E.V.; SHAKHTSHNEIDER, T.P.; VASILCHENKO, M.A.; AHSBAHS, H.; UCHTMANN, H. Anisotropic crystal structure distortion of the monoclinic polymorph of acetaminophen at high hydrostatic pressures. *Acta Crystallographica Section B-Strutural Science*, v.56(2), p.299-309, 2000.

BOTT, R.F.; OLIVEIRA, W.P. Storage Conditions for Stability Testing of Pharmaceuticals in Hot and Humid Regions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.33(4), p.393-401, 2007.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterization drug molecule



exhibiting polymorphic and glass forming tendencies.  
*International Journal of Pharmaceutics*, v.192, p.47-53, 1999.

BOURICH, H.; BRIK, Y.; HUBERT, P.; CHERRAH, Y.;  
 BOUKLOUZE, A. Solid-state characterization and impurities  
 determination of fluconazol generic products marketed in  
 Morocco. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012-. Disponível  
 em [http://ac.els-cdn.com/S2095177912000949/1-s2.0-S2095177912000949-main.pdf?\\_tid=50562070-2718-11e2-9c56-00000aab0f6c&acdnat=1352099795\\_71b4ad9ec403b4f0403acd3b64b5bc99](http://ac.els-cdn.com/S2095177912000949/1-s2.0-S2095177912000949-main.pdf?_tid=50562070-2718-11e2-9c56-00000aab0f6c&acdnat=1352099795_71b4ad9ec403b4f0403acd3b64b5bc99)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância à saúde.  
 Secretaria de atenção à saúde. Diretrizes e Recomendações  
 para o cuidado integral de doenças crônicas não transmissíveis.  
 Série pactos pela saúde 2006. Brasília: Ministério da saúde,  
 2008. 72 p.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29  
 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de  
 Estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 2005.

\_\_\_\_\_; Lei Nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004. Lei de  
 inovação Tecnológica. Dispõe sobre incentivos à inovação e à  
 pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá  
 outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2004.

\_\_\_\_\_; Lei Nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e  
 obrigações relativos à propriedade industrial. Diário Oficial da  
 União, Brasília, 1996.

BRESLOW, J.L. Cardiovascular disease burden increases, NIH  
 funding decreases. *Nature Medicine*, v.3, p. 600-601, 1997.

BRITAIN, H.G.; BUGAY, D.E.; BOGDANOWICH, S.J.;  
 DEVICENTIS, J. Spectral Methods for Determination of Water.  
*Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.14(14), p.2029-  
 2046, 1988.

BRITTAİN, H.G. Polymorphism and Solvatomorphism 2009. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.100(4), p.1260-1279, 2011.

BRITTAİN, H.G. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1999. 427p.

BRITTAİN, H.G. What is the correct method to use for particle-size determination? *Pharmaceutical Technology*, v.25 (7), 96–98, 2001.

BRITTAİN, H.G. Spectral methods for the characterization of polymorphs and solvates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86(4), p.405-412, 1997.

BROWN, M.E.; ANTUNES, E.M.; GLASS, B.D.; LEBETE, M.; WALKER, R.B. DSC Screening of Potential Prochlorperazine-Excipient Interactions in Preformulation Studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.56(3), p.1317-1322, 1999.

BROWN, W.V. Safety of statins. *Current Opinion in Lipidology*. V.19, p.558-562, 2008.

BRUNTON, L.L.; KNOLLMAN, B.C.; CHABNER, B.A. Eds. Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana, 2006. p. 837-894.

BRUSAU, E.V.; CAMÍ, G.E.; NARDA, G.E.; CUFFINI, S.; AYALA, A.P.; ELLENA, J. Synthesis and Characterization of a New Mebendazole Salt: Mebendazole Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.97(1), p.542-551, 2008.

BRUCKERT, E.; HAYEM, G.; DEJAGER, S.; YAU, C.; B'ÉGAUD, B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients - the primo study. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v.19, p.403-414, 2005.

BUCKTON, G. Delineamento de formas farmacêuticas: Propriedades do estado sólido. 2ªed. Porto Alegre In: AULTON, M. E.; ORTEGA, G.G, Artmed, 2005. Cap 9.

BUDAVARI, S. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14ª ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006. p.143, 722, 968, 1325, 1471.

BUGAY, D.E.; Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.48(1), p.43-65, 2001.

BYRN, S.R.; PFEIFFE, R.R.; STOWELL, J.G. In: Miscellaneous Topics. Solid-State chemistry of Drugs. 2<sup>nd</sup> Ed. West Lafayette: SSCI, 1999. cap.22, p.489.

CAIRA, M.R.; BETTINETTI, G.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L. Relationships between structural and thermal properties of anhydrous and solvated crystalline forms of brodimoprim. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.96, p.996-1007, 2007.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica. 3ª.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2000. 752p.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova*, v.30(2), p425-430, 2007.  
CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. *Drug Stability Principles and Practices*. 3ªed. Revised and Expanded. New York: Ed. Marcel Dekker, 2000, 773 p.

CAYTAN, E.; REMAUD, G.S.; TENAILLEAU, E.; AKOKA, S. Precise and accurate quantitative <sup>13</sup>C NMR with reduced experimental time. *Talanta*, v.71(3), p.1016 – 1021, 2007.

CERMOLA, F.; DELLAGRECA, M.; LESCE, M.R.; MONTANARO, S.; PREVITERA, L.; TEMUSSI, F. Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water. *Tetrahedron*, v.62, p.7390-7395, 2006.

CERMOLA, F.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M.R.; MONTANARO, S.; PREVITERA, L.; TEMUSSI, F. BRIGANTE, M. Irradiations of fluvastatin in water structure elucidation of photoproducts. *Journal*

of *Photochemistry and photobiology A: Chemistry*, v.189, p.264-271, 2007.

CHAVHAN, B.; AWASTHI, A.K.; AGGARWAL, R.; BEENA, R.S.; PAUL, S.; THAPER, R.K.; DUBEY, S.K. *Novel Polymorphic Forms of Fluvastatin Sodium and Process for Preparing the Same*. Patent application number 20080207919. 28.08.2008. Acessado em 28.10.2012.

CHEMBURKAR, S.R.; BAUER, J.; DEMING, K.; SPIWEK, H.; PATEL, K.; MORRIS, J.; HENRY, R.; SPANTON, S.; DZIKI, W.; PORTER, W.; QUICK, J.; BAUER, P.; DONAUBAUER, J.; NARAYANAN, B.A.; SOLDANI, M.; RILEY, D.; MCFARLAND, K. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Research Development*, v.4, p.413-417, 2000.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEM, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.55, p.618-644, 2011.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*, v.17, p.1259-1264, 1996.

CLAS, S.; DALTON, C.; HANCOCK, B.; Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Sciences and Technology*, v.2(8), p.311-320, 1999.

CUFFINI, S.L.; PAULINO, A.S.; RAUBER, G.; CAMPOS, C.E.; MAURÍCIO, M.H.; DE AVILLES R.R.; CAPOBIANCO, G.; CARDOSO, S.G.; CUFFINI, S.L. The crystal structure and physical characteristics of deflazacort. *Steroids*, v.72, p. 261-269, 2007.

CUI, Y. A material science perspective of pharmaceutical solids. *International Journal of Pharmaceutics*, v.339 (1-2), p.3-18, 2007.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Matéria (RJ)*, v.12(1), p.134-139, 2007.

ECKARDSTEIN, A. *Atherosclerosis: diet and drugs*. Alemanha: Ed. Springer, 2005. 823p.

EMERTON, D. Patent Expiries in the US Statin Market: Generics to Slash Market Size by 80 per Cent over the Next Ten Years. *Journal of Generic Medicines*, v.4(1), p.73-78, 2006.

ENMAN, J.; PATRA, A.; RAMSER, K.; ROVA, U.; BERGLUND, K.A. Solid State Characterization of Sodium Eritadenate. *American Journal of Analytical Chemistry*, v.2, p.164-173, 2011.

ERTÜRK, S.; ÖNAL, A.; ÇETIN, S.M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *Journal of Chromatography B*, v.793(2), p.193-205, 2003.

FANNING, E.L. Evidence-based disease management: its role in cardiovascular risk reduction. *Disease Management*, v.7(1), p.7-10, 2004.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. Rockville: FDA, 2007. 13p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>. Acessado em 28.10.2012.

FDA. Food and Drug Administrations. Orange Book: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. 31/12/1993. Disponível em [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/obdetail.cfm?Appl\\_No=020261&TABLE1=OB\\_Rx](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/obdetail.cfm?Appl_No=020261&TABLE1=OB_Rx) Acessado em 28.10.2012.

FETH, M.P.; NAGEL, N.; BAUMGARTNER, B.; BROCKELMANN, M.; RIGAL, D.; OTTO, B.; SPITZENBERG, M.; SCHULZ, M.; BECKER, B.; FISCHER, F.; PETZOLDT, C. Challenges in the

development of hydrate phases as active pharmaceutical ingredients – An example. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42, p.116-129, 2011.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia: Propriedades do estado sólido*. 3ª Ed. São Paulo: In: FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D., 2003. 732p.

FORD, J.L.; TIMMINS, P.; *Pharmaceutical thermal analysis*. Techniques and applications. Chichester: EllisHorwood, 1989. 313p.

FRANC, S.; DEJAGER, S.; BRUCKERT, E.; CHAUVENET, M.; GIRAL, P.; TURPIN, G. A Comprehensive description of muscle symptoms associated with lipid-lowering drugs. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. V.17, p.459-465, 2003.

FUKUDA, D.; ENOMOTO, S.; SHIRAKAWA, I.; NAGAI, R.; SATA, M. Fluvastatin accelerates re-endothelialization impaired by local sirolimus treatment. *European Journal of Pharmacology*, v.612, p.87-92, 2009.

GAMBERINI, M.C.; BARALDI, C.; TINTI, A.; RUSTICHELLI, C.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, G. Solid state characterization of chloramphenicol palmitate. Raman spectroscopy applied to pharmaceutical polymorphs. *Journal of Molecular Structure*, v.785, p.216–224, 2006.

GAW, A. *Statins the HMG-CoA reductase inhibitors in perspective: Hyperlipidaemia as a risk factor for vascular disease*. In: GAW, A.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. 2.ed. 2004. Espanha: Grafos SA, 1-17p.

GEPPI, M.; MOLLICA, G.; BORSACCHI, S.; VERACINI, A. Solid-state NMR studies of pharmaceutical systems. *Applied Spectroscopy Reviews*, v.43(3), p.202-302, 2008.

GEOFF, G.Z.; ZHOU, Z.; ZHOU, D. *Crystalline and Amorphous Solids*. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice*. 1 ed., United States of America: Elsevier Inc., 2009. p.25-60.

GHUGARE, P.; DONGRE, V.; KARMUSE, P.; RANA, R.; SINGH, D.; KUMAR, A.; FLIMWALA, Z. Solid state investigation and characterization of the polymorphic and pseudopolymorphic forms of indapamide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.51, p.532-540, 2010.

GIACOVAZZO, C.; MONACO, H.L.; VITERBO, D.; SCORDARI, F.; GILLI, G.; ZANOTTI, G.; CATTI, M. *Fundamentals of Crystallography*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press: GIACOVAZZO, C., 2002. 848p.

GIL-ALEGRE, M.E.; BERNABEU, J.A.; CAMACHO, M.A.; TORRES-SUAREZ, A.I. Statistical evaluation for stability studies under stress storage conditions. *Il Farmaco Pavia*, v.56, p.877-883, 2001.

GIRON, D.; GOLDBROWN, Ch.; MUTZ, M.; PFEFFER, S.; PIECHON, Ph. Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.68, p.453-465, 2002.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. *Thermochimica acta*, v.248, p.1-59, 1995.

GLADDEN, F.L.; Nuclear magnetic resonance in chemical engineering: Principles and applications. *Chemical Engineering Science*, v.49(20), p.3339-3408, 1994.

GLASS, B.D.; NOVAK, C.S., BROWN, M.E. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, V.77 (3), p.1013-1036, 2004.

GOMES, F.P.; GARCIA, P.L.; ALVES, J.M.P.; SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Development and validation of stability-indicating HPLC methods for quantitative determination of pravastatin, fluvastatin, atorvastatin and rosuvastatin in pharmaceuticals. *Analytical letters*, v.42(12), p.1784-1804, 2009.

- GOODHEW, P.J.; HUMPHREYS, J.; BEANLAND, R.; Electron Microscopy and Analysis, 3<sup>rd</sup> ed, Taylor & Francis, 2000. 254p.
- GRABARKIEWICZ, T.; GROBELNY, P.; HOFFMANN, M.; MIELCAREK, J. Study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of fluvastatin. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v.4, p.4299-4306, 2006.
- GRAESER, K.A.; STRACHAN, C.J.; PATTERSON, J.E.; GORDON, K.C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. *Crystal growth and design*, v.8(1), p.128-135, 2008.
- GROBELNY, P.; VIOLA, G.; VEDALDI, D.; DALL'AQUA, F.; GLISZCZYNSKA-SWIQLO, A.; MIELCAREK, J.; Photostability of pitavastatin – A novel HMG-CoA reductase inhibitor. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v.50, p.597-601, 2009.
- GRZESIAK, A.L.; LANG, M.; MATZGER, A.J. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.92(11), p.2260–2271, 2003.
- GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHIMDT, B.; AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.54, p.1545–1547, 1965.
- GU, C.; YOUNG, Jr. V.; GRANT, D.J.W. Polymorph Screening: Influence of Solvents on the Rate of Solvent-mediated Polymorphic Transformation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.90, p. 1978-1890; 2001.
- GUO, Y. *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Impact of Solid-State Characteristics to the Physical Stability of Drug Substance and Drug Product*. Ed. Kim Huynh-Ba, Newark, Delaware, Pharmalytic, Springer, 2010. 389p.
- HAINES, P.J.; Thermal Methods of Analysis: Principles, Applications and Problems. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.45(1-2), p.35-336, 1995.



HALEBLIAN, J.; Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.64(8), p.1269-1288, 1975.

HANCOK, B.C.; YORK, P.; ROWE, R.C. The use of solubility parameters in pharmaceutical dosage form design. *International Journal of Pharmaceutics*, v.148(1), p.1-21, 1997.

HANGMAN, E.W.; LEE, S.K.; BRITT, P.F.; Synthesis and Solid State  $^{13}\text{C}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR Characterization of Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acid Fluoride Polymers. *Analytical Chemistry*, v.69(19), p.3950-3958, 1997.

HARRIS, R.K.; Applications of solid-state NMR to pharmaceutical polymorphism and related matters. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology*, v.59(2), p.225-239, 2007.

HARRIS, R.K. NMR studies of organic polymorphs & solvates. *The Analyst*, v.131, p.351-373, 2006.

HARROLD, M. *Antihyperlipoproteinemics and inhibitors of cholesterol biosynthesis : Foye's Principals of medicinal chemistry*. 5<sup>a</sup>ed. Philadelphia: WILLIAMS, D.A.; LEMICE, T.L., Eds. Lippincott Williams & Williams, 2002. p580-603.

HILFIKER, R. *Polymorphism: in the pharmaceutical industry*. 1<sup>st</sup> ed. New York, John Wiley, 2006. 414p.

HOFFMANN, M.; NOWOSIELSKI, M. DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v.6, p.3527-3531, 2008.

HORVATH, K. Polymorphic compounds. Patent application number: US 6124340.26.09.2000. Acessado em 28.10.2012.

HUANG, L. Anhydrous amorphous form of fluvastatin. Patent application number: US 7241800. 10.07.2007. Acessado em 28.10.2012.

HUANG, L.F; TONG, W.Q.; Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.321– 334, 2004.

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.41(6), p.413–450, 2001.

ICH – *Impurities in new drug products Q3B (R2)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2006b.

ICH – *Impurities in new drug substances Q3A (R2)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2006a.

ICH - *Stability Testing of New Drug substances and Products Q1A(R2)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2003.

ICH - Quality Guidelines. *Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances (including Decision Trees)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1999.

ICH - *Stability Testing: Photostability Testing Of New Drug Substances And Products Q1B*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1997.

ICH – *Stability testing: photostability testing of new drug substances and products*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.

ICH – *Guidance of specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals S2A*. International Conference on

Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1995.

INFANTES, L.; CHISHOLM, J.; MOTHERWELL, S.; Extended motifs from water and chemical functional groups in organic molecular crystals. *Cryst Eng Comm*, v.5, P.480-486, 2003.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, v.292, p.1160-1164, 2003.

JENKINS, R.; SNYDER R.L. Introduction to X-Ray Powder Diffractometry. New York: Wiley-Interscience, 1996. 403p

JOSAN, K.; MAJUMDAR, S.R.; MCALISTER, F.A. The efficacy and safety of intensive statin therapy: a meta-analysis of randomized trials. *Canadian Medical Association Journal*, v.178(5), p.576-584, 2008.

KABADI, M.B.; VIVILECCHIA, R.V. *Stabilized pharmaceutical compositions comprising an HMG-CoA reductase inhibitor compound*. Patent application number US5356896. 18.10.1994. Acessado em 28.10.2012.

KAHELA, P.; AALTONEN, R.; LEWING, E.; ANTTILA, M.; KRISTOFFERSSON, E. Pharmacokinetics and dissolution of two crystalline forms of carbamazepine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.14, p.103-112, 1983.

KALINKOVA, G.N. Infrared spectroscopy in Pharmacy. *Vibrational spectroscopy*, v.19, p.307-320, 1999.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SNAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO Essential Drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1(1), p.85-96, 2003.

KERNS, E.H. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.90(11), p.1838-1858, 2001.

KIM, H.; GAO, J.; BURGESS, D.J. Evaluation of solvent effects on protonation using NMR spectroscopy: Implication in salt formation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.377, p.105-111, 2009.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; DE GRIEND, C.S.; VAN DEN BELD, C.; SOMNSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*, v.Feb(2), p.48-66, 2005.

KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *International Journal of Pharmaceutics*, v.193, p.137-146, 2000.

KOLTAI, T.; PINCHASOV, M.; FRENKEL, G. *Fluvastatin sodium novel forms and preparation thereof*. Patent application number US 2008/0027125 A1. 31.01.2008. Acessado em 28.10.2012.

KOMMANABOYNA, B.; RHODES, C.T., Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.25(7), p.857-868, 1999.

KRACUN, M.; KOCIJIAN, A.; GRAHEK, R.; PLAVEC, J.; KOCJAN, D. Isolation and structure determination of oxidative degradation products of atorvastatin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v.50, p.729-736, 2009.

KREISBERG, R.A.; OBERMAN, A. Lipids and atherosclerosis: lessons learned from randomized controlled trials of lipid lowering and other relevant studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.87, p.423-437, 2002.

KUHNERT-BRANDSTATTER, M.; *Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals*. International series of monographs

in analytical chemistry. New York: Pergamon Press, 1971. Volume 45.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J.; *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica: Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química*. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L.;. Lisboa: Calouste Gulben Kian, 2001. p.1277-1355, v.2.

LAWES, C.M.M.; HOORN, S.V.; LAW, M.R.; RODGERS, A. *High cholesterol*. In: *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*. EZZATI, M. (Ed.). WHO Press: Geneva, v1, p.391-496. 2004. Versão online. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 29 abr 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de bioquímica. 4ªed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

LEVY, R.I.; TROENDLE, A.J.; FATTU, J.M.; A quarter century of drug treatment of dyslipoproteinemia, with a focus on the new HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatina. *Circulation*, v.87(4), p.45-53, 1993.

LI, J.J. *Triumph of the heart: the history of statins*. 1<sup>st</sup> Ed. New York. Oxford University Press. 2009. 224p.

LI, R.; MAYER, P.T.; TRIVEDI, J.S.; FORT, J.J. Polymorphism and crystallization behavior of abbott-79175, a second-generation 5-lipoxygenase inhibitor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85(7), p.773-780, 1996.

LIFSHITZ-LIRON, R.; KOLTAL, T.; ARONHIME, J.; PERLMAN, N.; AVHAR-MAYDAN, S. *Fluvastatin sodium crystal forms, processes for preparing them, compositions containing them and methods to using them*. Patent application number: US 20090209611A1.19.08.2008. Acessado em 28.10.2012.

LIPINSKI, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced. Drug Delivery Reviews*, v.46, p.3-26, 2001.

MARTIN, A. Kinetics. Physical Pharmacy. 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1993. cap 12, p. 284-317.

MARTINO, P.D.; CENSI, R.; BARTHÉLÉMY, C.; GOBETTO, R.; JOIRIS, E.; MASIC, A.; ODOU, P.; MARTELLI, S.  
Characterization and compaction behaviour of nimesulide crystal forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v.342(1-2), p.137-144, 2007.

MEYER, M.C.; STRAUGHN, A.B.; JARVI, E.J., WOD, G.C.; PELSOR, F.R.; SHAH, V.P. The bioinequivalence of carbamazepine tablets with a history of clinical failures, *Pharmaceutical Research*, v.9(12), p.1612-1616, 1992.

MIELCAREK, J.; KULA, M.; ZYCH, R.; GROBELNY, P. Kinetic studies on fluvastatin photodegradation in solution. *Reaction kinetics and catalysis letters*, v.86(1), p.119-126, 2005.

MIELCAREK, J.; GROBELBY, P.; OSMALEK, T. Identification of photoproducts of fluvastatin in solutions. *Journal of planar chromatography – modern TLC*, v.22(2), p.137-140, 2009a.

MIELCAREK, J.; NASHRENT, M.; GROBELNY, P.  
Photochemical properties of sinvastatin and lovastatin induced by radiation. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, v.96(1), p.301-305, 2009b.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; CLARKE, E.G.C. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3<sup>o</sup> Ed. Ed. Pharmaceutical Press, 2004. Volume1.

MOREIRA, R.O.; SANTOS, R.D.; MARTINEZ, L.; SALDANHA, F.C.; PIMENTA, J.L.A.C.; FEIJOO, J.; JAHNKE, N.; MANGILE, O.C.; KUPFER, R. Perfil Lipídico de Pacientes Com Alto Risco para Eventos Cardiovasculares na Prática Clínica Diária. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v.50(3) p.481-489, 2006.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D.; Análise térmica de materiais, 1ª Ed. São Paulo: Ed Artliber, 2009. 300p.

NCEP: National Cholesterol Education Program; National Heart, Lung, and Blood Institute; *National Institutes of Health*; NIH Publication No. 02-5215 September 2002.

NAKASHIMA, A.; SAXER, C.; NIINA, M.; MASUDA, N.; IWASAKI, K.; FURUKAWA, K. Determination of fluvastatin and its five metabolites in human plasma using simple gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.760(1), p.17-25, 2001.

NETZ, P.; ORTEGA, G. *Fundamentos de Físico-Química*. 1ªed., Porto Alegre: Artmed, 2002.

NUDELMAN, N. S. *Estabilidad de medicamentos*. 1ª ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1975, 187p.

NUNES L.C.C.; SOARES SOBRINHO, J.L.; DE LIMA, A.A.N.; DA SILVA, J.L.; ROLIM NETO, P.J. Câmara climática: estudo de caso. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.88(3), p.137-140, 2007.

NUNES, J. D. S.; OLIVEIRA, L. G. D.; *Universidades Brasileiras - Utilização do Sistema de Patentes de 2000 a 2004*, Instituto Nacional da Propriedade Industrial: Rio de Janeiro, 2007.

O'DONNELL, P.B.; BOKER, A.D.; *Remington: the science and practice of pharmacy*. Stability of pharmaceutical products. 21<sup>th</sup> ed. Philadelphia: TROY, D.B. 2006. The University of Sciences, cap 52, p. 1025-1036.

OCHOA, D.V.; ALEGRE, E.V.; DURÁN, J.T. Preformulación. *Tecnología Farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas Farmacéuticos e Operaciones Básicas*. 1ª Ed. Madrid, Síntesis, VILA JATO, J.L., 2001. p.69-142.

OHTAWA, M.; UCHIYAMA, N.; SAITO, Y. Phase I study of MK-733, an inhibitor of HMG-CoA reductase II, Pharmacokinetics of MK-733 in healthy subjects after single and multiple oral administration, *Rinsho Iyaku*, v. 5, p.1123-1140, 1989.

PALACIO, M.A.; CUFFINI, S.; BADINI, R.; KARISSON, A.; PALACIOS, S.M. Solid-state characterization of two polymorphic forms of *R*-albuterol sulfate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, p.1531–1534, 2007.

PANDA, H.S.; DRIVASTANA, R.; BAHADUR, D. In-Vitro Release Kinetics and Stability of Anticardiovascular Drugs-Intercalated Layered Double Hydroxide Nanohybrids. *Journal of Physical Chemistry B*, v.113(45), p.15090-15100, 2009.

PAPAGEORGIOU, G.Z.; PAPADIMITRIOU, S.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, E.; DOCOSLIS, A.; BIKIARIS, D. Improvement in chemical and physical stability of fluvastatin drug through hydrogen bonding interactions with different polymer matrices. *Current Drug Delivery*, v.6, p.101-112, 2009.

PARK, H.J.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; CHO, W.; PARK, J.; CHA, K.H.; KANG, Y.S.; HWANQ, S.J. Solid state carbon NMR characterization and investigation of intrinsic dissolution behavior of fluconazole polymorphs, anhydrate forms I and II. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.58 (9), p.1243–1247, 2010.

PARK, H.J.; KIM, M.S.; CHO, W.; PARK, J.; CHA, K.H.; KANG, Y.S.; HWANG, S.J. Use of CP/MAS solid-state NMR for the characterization of solvate molecules within estradiol crystal forms. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.60, p.407-412, 2005.

PELTONEN, L.; LILIEROTH, P.; HEIKKILA, T.; KONTTURI, K.; HIRVONEN, J. Dissolution testing of acetylsalicylic acid by a channel flow method – correlation to USP basket and intrinsic dissolution methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.19(5), p.395-401, 2003.



PEREZ, S.C.; CERIONI, L.; WOLFENSON, A.E.; FAUDONE, S.; CUFFINI, S.L. Utilization of pure nuclear quadrupole resonance spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v.298, p.143-152, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 6ª.ed. São Paulo: Elsevier, 2008. p.321-330.

RAO, B.S.; MOHMAN, J.M.S.; YATENDRA, K.; YEKANATHSA, M.A. *A novel crystalline polymorph of fluvastatin sodium and process for preparing it*. Patent application number WO2007039784A2. Acessado em 28.10.2012.

REUTZEL-EDENS, S.M.; BUSH, J.K.; Solid-state NMR spectroscopy of small molecules: From NMR crystallography to the characterization of solid oral dosage forms. *American Pharmaceutical Reviews*, v.5, p.112-115, 2002.

REYNOLDS, D.W.; FACHINE, K.L.; MULIANEY, J.F.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*, v.Feb(2), p.48-56, 2002.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, *Material Research*, v.6(3), p.317-320, 2003.

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicology in Vitro*, v.14(6), p.497-504, 2000.

SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. São Paulo: Editora da UNESP, 1995.

SEHIC, S.; BETZ, G.; HADZIDEDIC, S.; EL-ARINI, S.K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. *International Journal of Pharmaceutics*. v.386, p.77-90, 2010.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M.J.; The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discovery Today*, v.13(9/10), p.440-446, 2008.

SHAW, A.; MANTSCH, H.H.; Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester :John Wiley & Sons Ltd, 2000. 20p.

SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L.; BANSAL, A.K. Solid State Characterization of Commercial Crystalline and Amorphous Atorvastatin Calcium Samples. *AAPS PharmSciTech*, v.11(2), p.598-609, 2010.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X.; Spectrometric identification of Organic Compounds. 6<sup>th</sup> ed. Toronto: John Wiley & Sons, 1997.

SIMON, P.; VEVERKA, M.; OKULIAR, J.; New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v.270, p.21-26, 2004.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. *Pharmaceutical Technology On-line*, v.abril, p.1-24, 2000.

SINGHAL, D. CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.335-347, 2004.

SINKO, P. J.; TAYLOR, S. MARTIN: *Físico-Farmácia e ciências farmacêuticas*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 810p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J.F.; NIEMAN, T.A.; Princípios de análise instrumental. 5<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. Capítulo 19.

SNYDER, R.D.; EWING, D.; HENDRY, L.B.; DNA intercalative potencial of marketed drugs testing positive in *in vitro* cytogenetics assays. *Mutation Research*, v.609, p.47-59, 2006.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W.; A review of a genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, v.488, p.151-169, 2001.

SORRENTI, M.; CATENACCI, L.; BRUNI, G.; LUPPI, B.; BIGUCI, F.; BETTINETTI, G. Solid-state characterization of tacrine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.63, p.53-61, 2012.

SPEZIALI, M.G.; GUIMARÃES, P.P.G.; SINSTERRA, R.D. Desmistificando a proteção por patentes nas universidades. *Química Nova*, v.35(8), p.1700-1705, 2012.

SPOSITO, A.C.; CAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.8, p.2-19, 2007.

STANISZ, B.; PASZUN, S.; STRZYZYCKA, N.; PTASZYNSKI, E. Influence of humidity and hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, glyceryl behenate or magnesium stearate on the degradation kinetics of quinapril hydrochloride in solid phase. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.67(1), p.99-102, 2010.

STEPHENSON, G.A., Structure determination from conventional powder diffraction data: application to hydrates, hydrochloride salts, and metastable polymorphs., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.89(7), p.958-966, 2000.

STEPHENSON, G.A.; FORBES, R.A.; REUTZEL-EDENS, S.M. Characterization of solid state: quantitative issues. *Advanced Drug Delivery Review*, v.48, p.67-90, 2001.

STOJAKOVIC, T.; DE CAMPO, A.; SCHARNAQL, H.; SOURJ, H.; SCHMOLZER, I.; WASCHER, T.C.; MARZ, W. Differential effects of fluvastatin alone or in combination with ezetimibe on lipoprotein subfractions in patients at high risk of coronary events. *European Journal of Clinical Investigation*, v.40(3), p.187-194, 2010.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo*, v.31(2), p.63-70, 1995.

SURI, S.; SARIN, G.S. *A novel crystalline polymorph of fluvastatin sodium and process for preparing it*. WO2004096765. New Delhi, 11.11.2004. Acessado em 28.10.1012.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical. Technology*, v.2(3), p.12-20, 1998.

THOMPSON, P.D.; CLARKSON, P.M.; ROSENSON, R.S. An assessment of statin safety by muscle experts. *The American Journal of Cardiology*, v.97(8A), 2006.

THRELFALL, T.L. Analysis of organic polymorphs – a review. *Analyst*, v.120(10), p.2435-2460, 1995.

TINETTI, M. Over-the-Counter Sales of Statins and Other Drugs for Asymptomatic Conditions. *The New England Journal of Medicine*, v.25, p.2728-2732, 2008.

TISHMACK, P.A.; BUGAY, D.E.; BYRN, S.R.; Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy -Pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.92(3), p.441-474, 2003.

TONNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International. Journal of Pharmaceutics*, v.225, p.1-14, 2001.

TORSON, H.; ERIKSSON, B.M. Liquid Chromatographic Determination of Fluvastatin and Its Enantiomers in Blood Plasma by Automated Solid-Phase Extraction. *Chromatographia*, v.45, p.29-34, 1997.

TORSON, H.; ERIKSSON, B.M. Determination of fluvastatin enantiomers and the racemate in human blood plasma by liquid

chromatography and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 729(1), p13-18, 1996.

TRUNG, T.Q.; DUNG, P.T.; HOAN, N.N.; KIM, D.J.; LEE, J.H.; KIM, K.H. Chiral separation of fluvastatin enantiomers by capillary electrophoresis. *Archives of Pharmacal Research*, v.31, p.1066-1072, 2008.

ULLMAN, F.; BOUTELLIER, R.; Physical layout of workspace: a driver for productivity in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.13(9/10), p.374-378, 2008.

UM, S.Y.; JUNG, S.H.; KIM, J.I.; CHUNG, S.Y.; LEE, H.J.; HAN, S.B.; CHOI, S.O. Column-switching high-performance liquid chromatographic analysis of fluvastatin in rat plasma by direct injection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41(4), p.1458-1462, 2006.

USP 35, The United States Pharmacopeia. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention Inc. 2012 <1087> Intrinsic Dissolution.

VADAS, E.B. Remington's: The science and practice of pharmacy. Stability of pharmaceutical products. 20<sup>th</sup> ed. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, GENARO, A. R., 2000. p.986-994.

VAN DER SCHAAF, P.A.; BLATTER, F.; SZELAGIEWICZ, M. *Crystalline form of fluvastatin sodium*. Patent application number: US2006/0241167A1. 26.10.2006. Acessado em 28.10.2012.

VAN DER SCHAAF, P.A.; BLATTER, F.; SZELAGIEWICZ, M. *Crystalline form of fluvastatin sodium*. Patent application number: US 7,432,380B2, United States.01.10.2008. Acessado em 28.10.2012.

VIEGAS, T.X.; CURATELLA, R.U.; VANWINKLE, L.L.; BRINKER, G. Intrinsic drug dissolution testing using the stationary disk system. *Dissolution Technologies*, v.8(4), p.1-4, 2001.

VILA JATO, J.L. *Tecnología Farmacéutica. Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. 2ª Ed. Madrid: Síntesis, 2001.

VIOLA, G.; GROBELNY, P.; LINARDI, M.A.; SALVADOR, A.; BASSO, G.; MIELCAREK, J.; DALL'AQUA, S.; VEDALDI, D.; DALL'AQUA, F. The Phototoxicity of Fluvastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Is Mediated by the formation of a Benzocarbazole-Like Photoproduct. *Toxicological Sciences*. v.118(1),p. 236-250, 2010.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W., Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.48, p.3-26, 2001.

WARTEWIG, S.; REINHARD, H.H.; NEUBERT, T.; Pharmaceutical Applications of Mid-IR and Raman Spectroscopy. *Advanced Drug Delivery Review*, v.57, p.1144-1177, 2005.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and Pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 1999. 337p.

WELLS, J. *Delineamento de formas farmacêuticas: Pré formulação farmacêutica*. 2ª Ed.. In: AULTON, M.E. Porto Alegre: Artmed, 2005. 678p.

WHO – World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. WHO Press: Geneva, 2009. 70p. Versão online. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 29 abr 2010.

\_\_\_\_\_. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. WHO Press: Geneva, 2007. 86p. Versão online. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 29 abr 2010.

WIGENT, R.J. Remington: the science and practice of pharmacy. Chemical kinetics. 21th ed. (ed). Philadelphia: In: TROY, D.B The university of the sciences, 2006. cap.19, p.266-280.

WILLART, J.F.; DESCAMPS, M. Solid state amorphization of pharmaceuticals. *Molecular Pharmaceutics*, v.5, p.905-920, 2008.

WOOD, J.H.; SYARTO, J.E.; LETTERMAN, H. Improved holder for intrinsic dissolution rate studies. *J Pharm Sci*, v.54, p.1068, 1965.

WOOD, E.A. *Crystal and Light. An introduction of Optical Microscopy*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Dover Publ, 1977.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.; Stability of drugs and dosage forms. New York: Plenum, 2000. 245p.

YU, L.X.; CARLIN, A.S; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S.; Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.270, p.221-227, 2004.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical . Research*, v.19, p.921–925, 2002.

ZACHARIA, J.T.; TANAKA, T.; HAYASHI, M. Facile and Highly Enantioselective Synthesis of (+)- and (-)-Fluvastatin and Their Analogues. *Journal of Organic Chemistry*, v.75, p. 7514-7518, 2010.

ZEISER, R.; MAAS, K.; YOUSSEF, S.; DURR, C.; STEINMAN, L.; NEGRIN, R.S. Regulation of different inflammatory diseases by impacting the mevalonate pathway. *Immunology*, v.127, p.18-25p, 2008.

ZHENG, G.; WANG, L.; HU, J.; ZHANG, X.; SHEN, L.; YE, C.; WEEB, G.A. Hydrogen Bonding Effects on the <sup>13</sup>C NMR Chemical Shift Tensors of Some Amino Acids in the Solid State. *Magnetic Resonance Chemistry*, v.35(9), p.606-608, 1997.